

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA  
ÁREA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**“Estudio transcriptómico global de la  
respuesta a los ácidos gálico y *p*-cumárico  
en *Lactobacillus plantarum* WCFS1”**

Memoria presentada por  
**INÉS MARÍA REVERÓN**

Para optar al grado de  
**Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos e Ingeniería Química**  
**Madrid, 2013**

Directores:

Félix López de Felipe

Rosario Muñoz

Blanca de las Rivas

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y  
NUTRICIÓN  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**



**Inés María Reverón Poján**

**Madrid, 2013**

**“Estudio transcriptómico global de la respuesta a los  
ácidos gálico y *p*-cumárico en *Lactobacillus*  
*plantarum* WCFS1”**

**Directores:** Dr. Félix López de Felipe, Dra. Rosario Muñoz y  
Dra. Blanca de las Rivas

**Tutor responsable:** Dra. Laura Jaime



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA  
ÁREA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y  
NUTRICIÓN**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**



**D. FÉLIX LÓPEZ DE FELIPE TOLEDANO, CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC, Dña. ROSARIO MUÑOZ MORENO, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL C.S.I.C, Y Dña. BLANCA DE LAS RIVAS GONZÁLEZ DEL REY, CIENTÍFICO TITULAR DEL MISMO INSTITUTO**

**CERTIFICAN:** Que la memoria del trabajo de investigación titulado: “**Estudio transcriptómico global de la respuesta a los ácidos gálico y *p*-cumárico en *Lactobacillus plantarum* WCFS1**” que presenta **Dña. Inés María Reverón**, en el Departamento de Química Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Procesos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del C.S.I.C., bajo nuestra dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a 09 de septiembre de 2013.

Directores de la Tesis

Dr. Félix López de Felipe.

Dra. Rosario Muñoz.

Dra. Blanca de las Rivas.



## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha realizado gracias a la financiación recibida de los Proyectos de Investigación AGL2008-01052 y AGL2011-22745 del Plan Nacional, y a la dirección del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, por haberme permitido disponer de sus instalaciones para la realización del mismo.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo, el Dr. Félix López de Felipe, la Dra. Rosario Muñoz Moreno y la Dra. Blanca de las Rivas, por todo el conocimiento que he aprendido de vosotros, por su gran dedicación durante mi formación científica y por todo el apoyo recibido a lo largo de estos años, tanto en el ámbito personal como profesional. Muchas gracias.

Agradezco a la Dra. Laura Jaime de Pablo por aceptar ser la Tutora de la presente tesis y apoyarme en todo lo relacionado al programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid. Gracias por la constante motivación para seguir adelante.

Al Dr. Alfonso Carrascosa por su orientación y motivación en la decisión de continuar con mis estudios de Doctorado.

A la Dra. Gloria García y todo el personal del Laboratorio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología por el conocimiento de transcriptómica y micromatrices que habeis compartido conmigo de forma incondicional. Gracias Iria e Irene.

A las Dras. Lourdes Garrido Amigo y Encarnación Pueyo por la ayuda que recibí de vosotras en el Instituto de Fermentaciones Industriales en todo lo referente a las actividades administrativas, lo cual me hizo sentir como en casa desde el primer momento.

A todos los compañeros de laboratorio incluidos el Dr. José Barcenilla y María Victoria Santamaría, por la ayuda que siempre están dispuestos a dar y la amabilidad que siempre demuestran. Gracias Pura, María, Natalia, Gerardo, Mónica, Pitu, Héctor, Vanessa y Laura por tantos momentos inolvidables...y gracias a los de antes también, Laurita, Edu, Dani y Chema y a los amigos de los de antes, Estrella y Tamara, porque representan la alegría y siempre hacen nacer una sonrisa en mi rostro.

A mis padres y mis tíos, a mi hermana Helen la científica, y a Ana María y José Rafael, los artistas, que infinitamente con su amor me acompañan en mi día a día compartiendo la alegría del vivir...

A todas aquellas personas, los amigos de allá y los de aquí, que con una palabra, acción o gesto siempre me motivan a seguir por el camino de la ciencia...

...y a Julio Serrano por acompañarme con espiritualidad en este sendero del que entiende poco pero del cual ya es participe.





A Julio,  
y a mis padres.



*“según lo que uno coma, así será su mente”*

*(yatha annam tatha manah)*

Dicho popular de la India

*“Nada incrementa tanto la posibilidad  
de supervivencia sobre la Tierra,  
como el paso a una alimentación vegetariana”.*

Albert Einstein

*“...haz de tu alimento tu medicina...”.*

Hipócrates



## **ÍNDICE GENERAL**



|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS .....   | xix |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| 1.1. Los compuestos fenólicos .....   | 3   |
| 1.1.1. Clasificación y su relación con los alimentos de origen vegetal.....   | 4   |
| 1.1.2. Propiedades sensoriales y saludables de los alimentos que se asocian a los compuestos<br>fenólicos.....  | 10  |
| 1.2. Las bacterias lácticas en alimentos y sustratos vegetales .....  | 13  |
| 1.2.1. Características microbiológicas, diversidad y versatilidad del género <i>Lactobacillus</i> .....   | 15  |
| 1.2.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....   | 16  |
| 1.3. Estudio de los mecanismos de respuesta y adaptación de las bacterias con su entorno.....   | 18  |
| 1.4. Efecto de los compuestos fenólicos en el crecimiento y viabilidad de las bacterias lácticas.....   | 23  |
| 1.4.1. Influencia de los compuestos fenólicos en <i>L. plantarum</i> .....  | 27  |
| 1.5. Metabolismo de compuestos fenólicos en bacterias lácticas.....   | 30  |
| 1.5.1. Metabolismo de compuestos fenólicos en <i>L. plantarum</i> .....   | 33  |
| 1.5.1.1. Degradación de taninos y ácido gálico: enzimas y genes involucrados.....   | 38  |
| 1.5.1.2. Degradación del ácido <i>p</i> -cumárico y otros ácidos hidroxicinámicos: enzimas<br>y genes involucrados.....   | 40  |
| II. OBJETIVOS.....  | 43  |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 47  |
| 3.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....  | 49  |
| 3.2. Medios, condiciones de cultivo y estudios del crecimiento.....   | 50  |
| 3.2.1. Efecto de los ácidos gálico y <i>p</i> -cumárico en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> . Cálculo de<br>la concentración mínima inhibitoria (MIC)..... | 50  |
| 3.2.2. Curva de crecimiento de las cepas mutantes vs. la cepa silvestre (“wild type” WT) de <i>L.</i><br><i>plantarum</i> WCFS.....                             | 54  |
| 3.3. Técnicas de ADN.....   | 55  |
| 3.3.1. Extracción del ADN bacteriano.....   | 55  |
| 3.3.2. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR .....  | 55  |
| 3.3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....   | 56  |
| 3.3.4. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa .....   | 57  |
| 3.3.5. Secuenciación del ADN .....  | 57  |
| 3.3.6. Análisis de secuencias .....   | 58  |
| 3.3.7. Manipulación del ADN con enzimas de uso común en biología molecular.....   | 58  |
| 3.3.8. Purificación de ADN plasmídico.....  | 58  |
| 3.3.9. Clonaje de genes en el vector pUCE191.....   | 58  |
| 3.4. Transformación genética de <i>E. coli</i> .....  | 59  |

|  |    |
|--|----|
| 3.4.1. Verificación rápida de la presencia de los plásmidos recombinantes en las células transformadas.....  | 60 |
| 3.5. Transformación genética de <i>L. plantarum</i> .....  | 61 |
| 3.6. Técnicas de ARN.....  | 62 |
| 3.6.1. Extracción del ARN bacteriano .....   | 62 |
| 3.6.1.1. Exposición de los cultivos de <i>L. plantarum</i> WCFS1 a los ácidos gálico y <i>p</i> -cumárico.....   | 62 |
| 3.6.1.2. Extracción y purificación del ARN .....   | 62 |
| 3.6.2. Concentración, pureza y calidad del ARN.....  | 63 |
| 3.6.3. Tratamiento del ARN para la eliminación de las trazas de ADN contaminante.....  | 64 |
| 3.7. Estudio transcripcional.....  | 64 |
| 3.7.1. Análisis de la expresión génica global mediante micromatrices de ADNc.....  | 64 |
| 3.7.1.1. Síntesis del ADN copia, marcaje e incorporación de los fluorocromos.....  | 64 |
| 3.7.1.2. Plataforma del ensayo: la micromatriz .....   | 65 |
| 3.7.1.3. Hibridación.....  | 66 |
| 3.7.1.4. Corrección, normalización y análisis de datos.....  | 66 |
| 3.7.2. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real.....   | 67 |
| 3.7.2.1. Síntesis del ADN copia mediante la enzima transcriptasa inversa.....  | 67 |
| 3.7.2.2. Diseño de los oligonucleótidos iniciadores o cebadores para el análisis mediante RT-qPCR.....   | 68 |
| 3.7.2.3. Ensayo de RT-qPCR.....  | 68 |
| 3.7.3 Validación del análisis de micromatrices de ADNc mediante un estudio comparativo del nivel de transcripción por RT-qPCR.....   | 73 |
| 3.8. Estudio mediante HPLC de la biotransformación de compuestos fenólicos en las cepas mutantes que poseen los genes <i>lpdC</i> ( <i>lp_2945</i> ) y <i>pdC</i> ( <i>lp_3665</i> ) no funcionales..... | 73 |
| 3.9. Estudios <i>in silico</i> .....   | 75 |
| 3.9.1. Predicción de la presencia de proteínas con dominios de transmembrana o secretoras.....   | 75 |
| 3.9.2. Estudio de la presencia de redes de regulación y posibles sitios de unión de los factores de transcripción (operadores o “binding sites”).....  | 76 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 77 |
| 4.1. Efectos de los ácidos gálico y <i>p</i> -cumárico en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> .....  | 79 |
| 4.1.1. Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias en las condiciones específicas del estudio.....   | 80 |
| 4.2. Análisis transcriptómico .....  | 83 |
| 4.2.1. Respuesta transcriptómica de <i>L. plantarum</i> WCFS1 en presencia del ácido gálico.....   | 90 |
| 4.2.1.1. Visión general .....  | 90 |
| 4.2.1.2. Mecanismos de detoxificación.....   | 94 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.2.1.3. Cambios relacionados con proteínas transportadoras de la membrana y pared celular y ahorro de energía.....   | 97  |
| 4.2.1.4. Interrupción del gen <i>lpdC</i> en <i>L. plantarum</i> .....  | 99  |
| 4.2.1.5. Influencia de la interrupción del gen <i>lp_2945 (lpdC)</i> en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> en presencia de ácido gálico.....   | 101 |
| 4.2.1.6. Interrupción del gen <i>lp_2945 (lpdC)</i> en <i>L. plantarum</i> y metabolismo del ácido gálico.....  | 104 |
| 4.2.1.7. Influencia de la interrupción del gen <i>lp_2945 (lpdC)</i> en el patrón de regulación transcripcional de los principales genes con expresión diferencial presencia del ácido gálico.....                | 105 |
| 4.2.2. Respuesta transcriptómica de <i>L. plantarum</i> WCFS1 en presencia de ácido <i>p</i> -cumárico...   | 109 |
| 4.2.2.1. Visión general.....  | 109 |
| 4.2.2.2. Mecanismos de destoxificación.....   | 113 |
| 4.2.2.3. Rutas metabólicas generales de respuesta al estrés .....   | 115 |
| 4.2.2.4. Adaptación de las principales actividades fisiológicas .....   | 116 |
| 4.2.2.4.1. Traducción.....  | 117 |
| 4.2.2.4.2. Metabolismo de pirimidinas y purinas.....  | 117 |
| 4.2.2.4.3. Metabolismo y transporte de carbono.....   | 118 |
| 4.2.2.4.4. Membrana y pared celular.....  | 120 |
| 4.2.2.5. Reconfiguración del metabolismo del nitrógeno.....   | 122 |
| 4.2.2.5.1. Catabolismo de péptidos.....   | 122 |
| 4.2.2.5.2. Metabolismo y transporte de aminoácidos.....   | 123 |
| 4.2.2.6. Respuesta al estrés oxidativo derivado de la presencia del ácido <i>p</i> -cumárico....  | 127 |
| 4.2.2.7. Genes del secretoma.....   | 129 |
| 4.2.2.8. Interrupción del gen <i>pdC</i> en <i>L. plantarum</i> .....   | 129 |
| 4.2.2.9. Influencia de la interrupción del gen <i>lp_3665 (pdC)</i> en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> en presencia del ácido <i>p</i> -cumárico .....  | 130 |
| 4.2.2.10. Interrupción del gen <i>lp_3665 (pdC)</i> y metabolismo de los ácidos <i>p</i> -cumárico, cafeico y ferúlico.....   | 134 |
| 4.2.2.11. Influencia de la interrupción del gen <i>lp_3665 (pdC)</i> en el patrón de regulación transcripcional de los principales genes con expresión diferencial en presencia del ácido <i>p</i> -cumárico..... | 137 |
| 4.2.2.12. Redes de regulación y su participación en la respuesta celular al estrés inducido por la presencia del ácido <i>p</i> -cumárico en <i>L. plantarum</i> .....  | 141 |
| 4.2.2.12.1. Regulones CtsR y HcrA.....  | 141 |
| 4.2.2.12.2. Regulón GlnR.....   | 145 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.2.12.3. Regulones PurR y PyrR.....  | 146 |
| 4.2.2.12.4. Regulón padR.....   | 148 |
| 4.2.2.12.5. Mecanismos de regulación anti-terminación por cajas “T-box”.....  | 149 |
| 4.2.3. Interacciones e interconexiones entre <i>L. plantarum</i> , los compuestos fenólicos y el ambiente intestinal..... | 151 |
| V. CONCLUSIONES .....   | 155 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA .....  | 159 |
| VII. APÉNDICES.....   | 183 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**



|                   |   |
|-------------------|---|
| A                 | Adenina   |
| aa                | aminoácido  |
| ADN               | Ácido desoxirribonucleico   |
| ADNc              | ADN copia   |
| ADNr              | Ácido desoxirribonucleico ribosómico                                      |
| AHC               | Acidos hidroxicinámicos   |
| AMP               | Adenosina-5'-monofosfato  |
| ARN               | Ácido ribonucleico  |
| ARNm              | Ácido ribonucleido mensajero  |
| ARNr              | Ácido ribonucleico ribosómico   |
| ARNr 16S          | Subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosómico                           |
| ATP               | Adenosina-5'-trifosfato   |
| ° C               | Grados Celsius  |
| C                 | Citosina  |
| cm                | Centímetro  |
| DO                | Densidad óptica   |
| DO <sub>600</sub> | Densidad óptica a una longitud de 600 nanómetros                          |
| dATP              | 2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato   |
| dCTP              | 2'-deoxicitidina-5'-trifosfato  |
| dGTP              | 2'-deoxiguanosina-5'-trifosfato   |
| dNTPs             | Desoxinucleótidos-5'-trifosfato   |
| dTTP              | 2'-deoxitimidina-5'-trifosfato  |
| E                 | Constante matemática  |
| <i>E</i>          | Energía   |
| ECN               | Estafilococos coagulasa-negativos   |
| EDTA              | Ácido etilendiaminotetracético  |
| FDR               | False discovery rate (tasa de resultados falsos)                          |
| G                 | Guanina   |
| g                 | Gramo   |
| GMP               | Guanosina-5'-monofosfato  |
| HCl               | Ácido clorhídrico   |
| HSP               | Heat shock protein (proteína de choque térmico)                           |
| h                 | Hora  |
| IMP               | Inosín-5'-monofosfato   |
| kb                | Kilobases   |
| KCl               | Cloruro de potasio  |
| M                 | Molar   |
| mg                | Miligramo   |
| Mb                | Millones de bases   |
| Mg <sup>2+</sup>  | Magnesio  |
| min               | Minutos   |
| ml                | Mililitro   |
| mM                | Milimolar   |
| MRS               | Medio de cultivo Man Rogosa Sharpe  |
| N                 | Normal  |
| NaCl              | Cloruro sódico  |
| NAD               | Dinucleótido de nicotinamida y adenina o nicotinamida adenín dinucleótido |
| ng                | Nanogramo   |
| nm                | Nanómetro   |
| PAGE              | Electroforesis en geles de poliacrilamida                                 |
| pb                | Pares de bases  |
| PCR               | Reacción en cadena de la polimerasa                                       |
| pH                | Potencial de hidrógeno  |
| ROS               | Reactive oxygen species (especies reactivas del oxígeno)                  |
| RP                | Proteínas ribosómicas   |
| RQ                | Expresión relativa de los genes (Relative Quantification)                 |
| RPM               | Medio de cultivo Rozès Peres  |
| rpm               | Revoluciones por minuto   |
| s                 | Segundos  |

|     |                             |
|-----|-----------------------------|
| SDS | Dodecil sulfato sódico      |
| T   | Timina                      |
| TAE | Tampón de Tris-Acetato EDTA |
| TGI | Tracto gastrointestinal     |
| U   | Uracilo                     |
| UV  | Ultravioleta                |
| V   | Voltio                      |
| vs. | Versus (comparando con)     |
| μF  | Microfaradio                |
| μg  | Microgramo                  |
| μl  | Microlitro                  |
| μm  | Micrometro                  |

## **I. INTRODUCCIÓN**





En esta primera sección se presenta una revisión de las investigaciones previas y los conceptos fundamentales relacionados con los compuestos fenólicos de las plantas y con la microbiota presente en sustratos vegetales que se emplean en la elaboración de alimentos, e incluye una descripción de sus características, propiedades organolépticas, interacción y relevancia debido a diversos efectos beneficiosos que sobre la salud se les han asociado.

## 1.1. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

El término compuestos fenólicos describe a un conjunto heterogéneo de moléculas que se encuentran de forma natural en las plantas y que poseen en su estructura uno o varios anillos bencénicos sustituidos por al menos un grupo hidroxilo o metoxi (Croteau *et al.*, 2000). Estas sustancias constituyen el principal grupo de metabolitos secundarios presentes en el reino vegetal, siendo esenciales para su crecimiento. Cumplen diversas funciones entre las que se describen defender contra predadores y patógenos; actuar como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas); atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas; ejercer protección frente a la radiación UV; aportar estabilidad estructural en los tejidos y actuar como aislantes que impermeabilizan las paredes celulares. Por tanto, la mayoría de éstas moléculas son bioactivas, interactúan con el medio ambiente y desempeñan un importante papel de protección contra el estrés abiótico y biótico en las plantas (Tohge *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos se localizan principalmente en los frutos, semillas, corteza y órganos aéreos jóvenes, por lo que se consumen diariamente en la dieta en cantidades significativas (Harborne y Williams, 2000). Muchos de ellos influyen en las propiedades organolépticas de los alimentos y bebidas que contienen materias primas de origen vegetal determinando en parte la calidad final de los mismos.

Las estructuras químicas de los compuestos fenólicos son muy diversas, incluyendo desde ácidos fenólicos simples de bajo peso molecular hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular como los taninos condensados y los hidrolizables. La mayoría de éstas sustancias y de sus precursores se sintetizan a través de la ruta del ácido siquímico intermediario en la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y de un grupo de metabolitos secundarios conocidos como fenilpropanoides, aunque también pueden obtenerse en menor medida a través de la ruta de síntesis de la

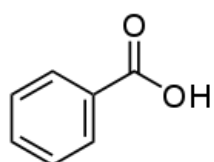
malonil-coenzima A (también denominada ruta del ácido malónico); o por ambas rutas como en el caso de los flavonoides (Robbins, 2003; Tohge *et al.*, 2013).

En la dieta humana las fuentes principales de compuestos fenólicos son las frutas, vegetales, aceite y bebidas tales como el té y café. La dieta mediterránea incluye además una variedad de productos vegetales fermentados tales como el vino y las aceitunas de mesa donde estos compuestos son responsables de algunas de sus características nutricionales y antioxidantes (Kapur y Kapoor, 2001; Dimitrios, 2006).

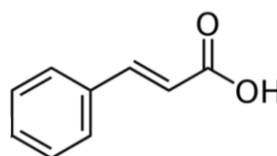
### 1.1.1. CLASIFICACIÓN Y SU RELACIÓN CON LOS ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en función del número de grupos fenoles que contienen, del número y tipo de grupo funcional que se une al anillo aromático y de los elementos estructurales que unen unos anillos a otros. De esta forma se puede distinguir entre los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Los flavonoides a su vez se dividen en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas). Adicionalmente, la diversidad de este grupo se incrementa por la asociación de los polifenoles con diversos carbohidratos y ácidos orgánicos (Manach *et al.*, 2004) (Tabla I).

Los ácidos fenólicos poseen un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo y un ácido carboxílico como grupo funcional y agrupan más de 8.000 compuestos sintetizados por plantas que forman parte de la estructura de las paredes celulares vegetales y de algunas vacuolas (Lynd *et al.*, 2002; Robbins, 2003). Se pueden dividir en dos grupos principales, los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico (Figura 1).



Ácido benzoico



Ácido cinámico

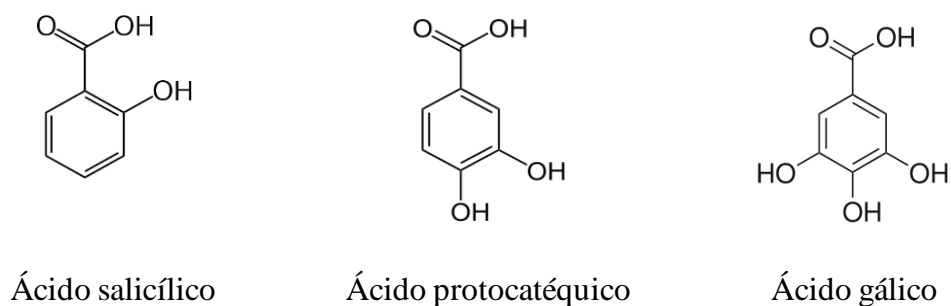
**Figura 1.** Estructura química de los ácidos benzoico y cinámico.

**Tabla I.** Compuestos fenólicos constituyentes de las plantas que con frecuencia son consumidos en la dieta humana.

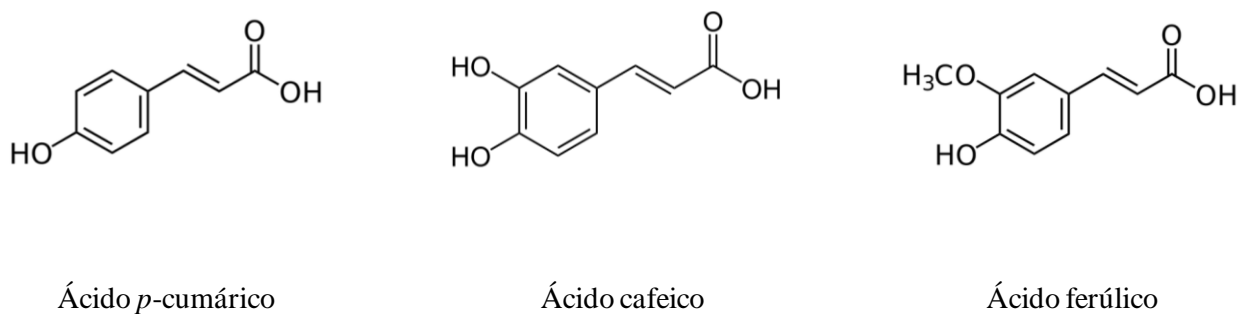
| División                         | Sub-división                                      | Compuesto  | Alimentos <sup>a</sup>               |                                |
|----------------------------------|---|--|--------------------------------------|--------------------------------|
| Ácidos fenólicos y sus derivados | Ácidos hidroxibenzoicos y derivados               | Ácido salicílico                                     | Sémola                               |                                |
|                                  |   | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico                      | Uva, avena, sorgo                    |                                |
|                                  |   | Ácido protocatéquico                                 | Mijo, colza, avena                   |                                |
|                                  |   | Ácido gálico   | Té, uva, mango, grosella, sémola     |                                |
|                                  |   | Pirogalol  | Café tostado                         |                                |
|                                  |   | Ácido elágico  | Mango, frambuesa                     |                                |
|                                  |   | Catecol  | Café, sémola                         |                                |
|                                  |   | Ácidos hidroxicinámicos                              | Ácido cinámico                       | Sorgo                          |
|                                  |   |  | Ácido <i>p</i> -cumárico             | Cebada, avena, mora, arándanos |
|                                  |   |  | Ácido <i>m</i> -cumárico             | Mora, arándanos                |
|                                  | Ácido <i>o</i> -cumárico                          |  | Avena, mora, arándanos               |                                |
|                                  | Ácido cafeico                                     |  | Mora, grosella                       |                                |
|                                  | Ácidos metoxi-benzoicos                           | Ácido clorogénico                                    | Café, arándanos, semillas de girasol |                                |
|                                  |   | Ácido siríngico                                      | Arándanos                            |                                |
|                                  | Ácidos metoxi-cinámicos                           | Ácido ferúlico                                       | Cereales, centeno, trigo, avena      |                                |
|                                  |   | Ácido sinápico                                       | Colza                                |                                |
|                                  | Derivados de los ácidos propiónicos               | Ácido florético                                      |                                      |                                |
|                                  |   | Ácido hidrocumárico                                  |                                      |                                |
|                                  |   | Ácido hidrocafeico                                   |                                      |                                |
|                                  |   | Ácido hidrofértilico                                 |                                      |                                |
|                                  | Vinil derivados                                   | Vinil fenol  | Arroz                                |                                |
|                                  |   | Vinil catecol  | Café tostado                         |                                |
|                                  |   | Vinil guayacol                                       | Arroz integral, café tostado         |                                |
| Etil derivados                   | Etil fenol  | Cacao  |                                      |                                |
|                                  | Etil catecol                                      | Café tostado   |                                      |                                |
|                                  | Etil guayacol                                     | Café tostado   |                                      |                                |
|                                  |   |  |                                      |                                |
| Flavonoides                      | Flavonas  | Apigenina  | Apio, perejil                        |                                |
|                                  |   | Luteolina  | Mijo                                 |                                |
|                                  | Flavonoles  | Kampferol  | Frambuesa                            |                                |
|                                  |   | Quercetina   | Arándanos, mango, frambuesa          |                                |
|                                  |   | Miricetina   | Mora                                 |                                |
|                                  | Flavanoles  | Catequina y epicatequina                             |                                      |                                |
|                                  |   | Galocatequinas                                       |                                      |                                |
|                                  |   | Epigalocatequina                                     | Té, vino, uva, cacao                 |                                |
|                                  |   | Galato de epigalocatequina                           |                                      |                                |
|                                  | Flavanonas  | Naringina y naringenina                              | Cítricos, pomelo o toronja           |                                |
|                                  |   | Hesperetina (hesperidina)                            | Naranja                              |                                |
|                                  | Isoflavonas                                       | Genisteína   |                                      |                                |
|                                  |   | Daiceína   | Soja                                 |                                |
| Antocianinas                     | Pelargonidina                                     |  |                                      |                                |
|                                  | Delfinidina                                       | Cebada oscura, frutos negros (grosella)              |                                      |                                |
|                                  | Petunidina  | Uva  |                                      |                                |
|                                  | Cianidina   | Cereza, frambuesa, fresa                             |                                      |                                |
| Taninos condensados              | Proantocianidinas                                 |  |                                      |                                |
|                                  | Dímeros, oligómeros y polímeros de las catequinas | Vino, algunas variedades de cebada                   |                                      |                                |
| Taninos hidrolizables            | Galotaninos                                       | Ácido tánico   | Roble, castaño, mango                |                                |
|                                  |   | Castalagina  | Vino, madera de roble, castaño       |                                |
|                                  | Elagitaninos                                      | Grandinina   |                                      |                                |
|                                  |   | Punicalina y punicalagina                            | Granada, frambuesa                   |                                |
| Estilbenos                       | Resveratrol                                       |  |                                      |                                |
|                                  | Piceatanol  | Vino tinto, uvas                                     |                                      |                                |
| Lignanós                         | Secoisolariciresinol                              | Semillas de lino, calabaza y ajonjolí, centeno, soja |                                      |                                |
|                                  | Enterolactona, enterodiol                         |  |                                      |                                |

<sup>a</sup> Algunos ejemplos de sustratos vegetales que se han descrito como fuente de cada compuesto fenólico. Tomado de: Scalbert, 1991; Manach *et al.*, 2004; Shahidi y Naczki, 2004; Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011; El-Seedi *et al.*, 2013.

Los primeros comparten la estructura C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> del ácido benzoico sobre la que se producen reacciones de hidroxilación y metilación dando lugar a los ácidos gálico, protocatéquico, *p*-hidroxibenzoico, vanillínico, elágico y siríngico (Figura 2). Los segundos son los ácidos fenólicos más comunes, tienen la estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, e incluyen los ácidos cinámico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico y clorogénico (Figura 3). Los ácidos fenólicos en su totalidad se asocian a cualidades sensoriales y nutricionales de los alimentos y constituyen un tercio de los compuestos fenólicos de la dieta (Maga, 1978; Vanbeneden *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Estructura química de tres ácidos hidroxibenzoicos.

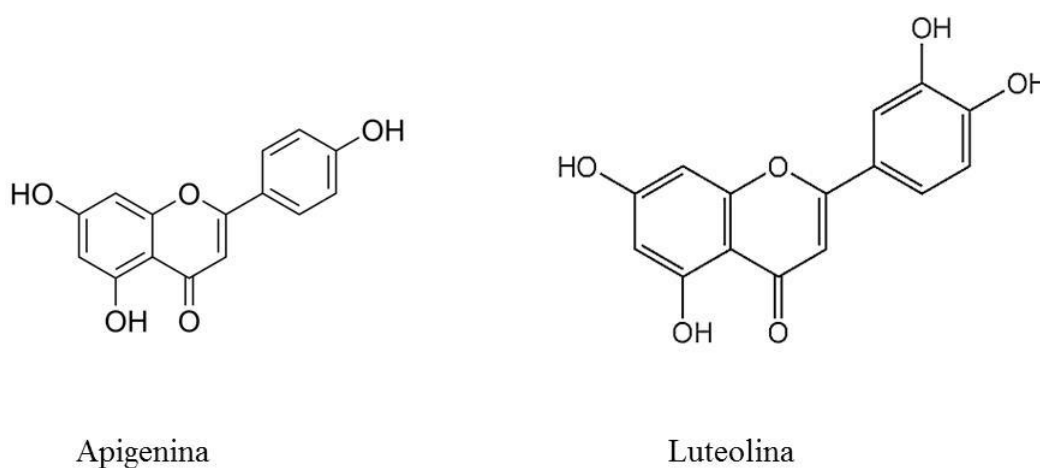


**Figura 3.** Estructura química de tres ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxibenzoicos se presentan en bajas concentraciones en frutas y verduras, excepto en frutos rojos donde aparecen los ácidos gálico y elágico, por la hidrólisis de los taninos hidrolizables (Tomás-Barberán y Clifford, 2000). El ácido *p*-hidroxibenzoico junto con el vanillínico se han descrito en la cáscara de avena y en frutas como el melón, fresa, cereza y uvas (Fleuriet y Macheix, 2003), aunque en éstas últimas también se ha observado la presencia de los ácidos gálico y siríngico (Bartolomé *et al.*, 2000).

Los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados son difíciles de encontrar en su forma libre en los alimentos vegetales, sin embargo el procesamiento por congelación, altas temperaturas y fermentación libera los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, entre otros (Manach *et al.*, 2004). El ácido cafeico, libre o esterificado, es el ácido fenólico que se encuentra con mayor frecuencia en las frutas, propóleo (propolis de abejas) y granos de café, sin embargo, el ácido ferúlico, que se observa en hojas y semillas en forma libre o asociado a la lignina, es el compuesto fenólico mayoritario en cereales, describiéndose también en naranjas, tomate y maíz dulce (Sri *et al.*, 2003; Maistro *et al.*, 2011).

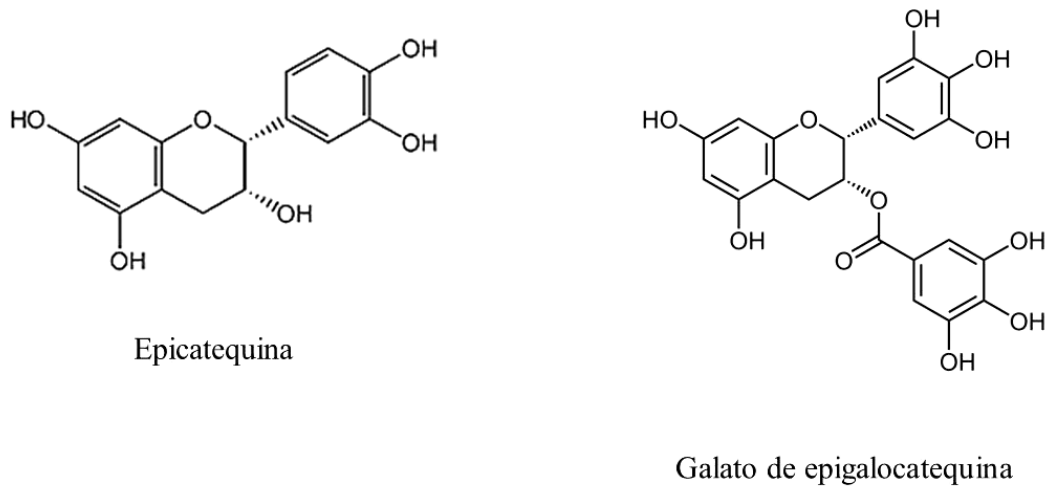
Los flavonoides son compuestos fenólicos con una gran variabilidad en su estructura donde comparten la presencia de dos anillos aromáticos que se unen entre sí por tres átomos de carbono para formar un anillo heterocíclico oxigenado formando así un sistema C<sub>15</sub> de tres anillos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Manach *et al.*, 2004) (Figura 4). Son muy abundantes en vegetales y están implicados en las propiedades organolépticas de frutas y verduras (Harborne y Williams, 2000). Se presentan en forma glicosilada asociados a una o dos moléculas de glucosa o ramnosa, exhibiendo características diferentes a las de sus correspondientes agliconas (Manach *et al.*, 2004). A este grupo de moléculas se le han atribuido muchas propiedades beneficiosas para la salud (Arts y Hollman, 2005).



**Figura 4.** Estructura química de dos flavonoides. Se aprecia la disposición (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>).

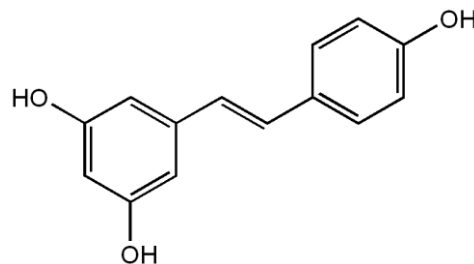
Entre los flavolones están la quercetina y el kampferol. Por otra parte, la catequina y la epicatequina son los principales flavanoles de las frutas, mientras que el galato de catequina, la epigallocatequina y el galato de epigallocatequina se encuentran en las semillas de plantas

leguminosas, uvas y de manera más importante en el té (Figura 5). Las isoflavonas poseen propiedades pseudohormonales, se clasifican como fitoestrógenos y se encuentran casi exclusivamente en las leguminosas como la soja, guisantes y habas (Manach *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Estructura química de dos flavanoles.

Los estilbenos están distribuidos de forma amplia en el reino vegetal, sin embargo son poco habituales en los alimentos y por tanto se presentan en muy bajas cantidades en la dieta humana. Básicamente su presencia se restringe a las uvas, el vino tinto, los cacahuets y distintas bayas del género *Vaccinium* como los arándanos y los mirtilos (Burns *et al.*, 2002; Lyons *et al.*, 2003; Rimando *et al.*, 2004; Gürbüz *et al.*, 2007). Entre los estilbenos más importantes se encuentra el resveratrol, molécula a la que se han asociado efectos anticarcinogénicos (Figura 6.). Se ha descrito que restos de orujos ricos en estilbenos, incluyendo el resveratrol y el glucósido astringente piceatannol, se pueden aprovechar para la elaboración de nutraceuticos y cosméticos.



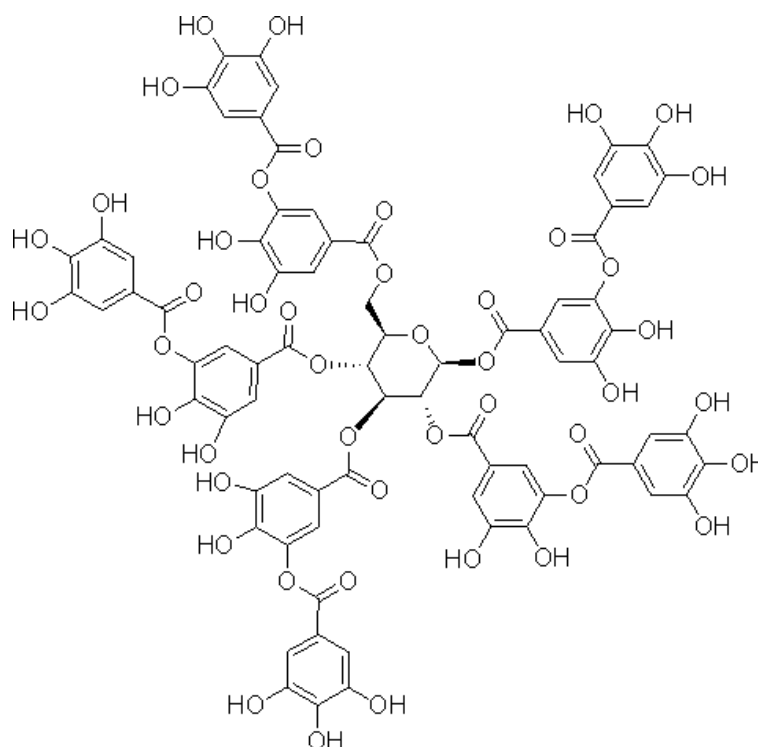
**Figura 6.** Estructura química del resveratrol (un estilbeno).

Los lignanos están formados por dos unidades de fenilpropano y la principal fuentes de estos compuestos en la dieta son las oleaginosas, específicamente las semillas de lino o linaza, sésamo y girasol, y en menor medida leguminosas como las lentejas, cereales (trigo y triticale), vegetales (ajos, zanahoria, espárragos y col rizada) y frutas (peras y ciruelas). Los lignanos son metabolizados a enterodiol y enterolactona (fitoestrógenos) por la microbiota intestinal, atribuyéndoles propiedades anticancerígenas en el colon y la mama, así como también mejoras en la salud cardiovascular (Pietinen *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2004).

En el fruto del olivo se ha descrito la presencia en alta proporción de la oleuropeína, un glucósido secoiridoide formado por la unión de tres moléculas: el hidroxitirosol, la glucosa y el ácido elenólico; responsable del carácter amargo de las aceitunas (Juven y Henis, 1970; Rozés y Peres, 1996).

Por último, los taninos son compuestos polifenólicos que poseen un elevado peso molecular, de entre 500 y 3.000 kDa (aunque algunos pueden llegar a los 30.000 kDa), que se caracterizan por su capacidad de precipitar proteínas. Se localizan en casi todas las partes de las plantas incluyendo las raíces, corteza, ramas, semillas y hojas. Se ha descrito su presencia en una multitud de alimentos como las fresas, moras, plátanos, nueces, caquis y granadas, entre otros y en bebidas como el vino, café y diversas variedades de té (Serrano *et al.*, 2009). Los taninos se dividen en taninos condensados e hidrolizables según su comportamiento frente a agentes hidrolíticos. Los primeros están formados por la polimerización de flavonoides y son frecuentes en la corteza y la madera de las plantas. Al ponerlos en presencia de sustancias hidrolíticas, los taninos condensados no liberan sus unidades estructurales y por el contrario, tienden a polimerizarse aún más, especialmente en soluciones ácidas, originando productos rojos insolubles. Por el contrario, los taninos hidrolizables, como el ácido tánico, liberan los ácidos fenólicos y los azúcares que los constituyen cuando son tratados con altas temperaturas, enzimas, ácidos o bases (Figura 7).

Se pueden diferenciar entre galotaninos (cuya hidrólisis libera ácido gálico) y elagitaninos (que liberan ácido elágico) (Li *et al.*, 2006). Los elagitaninos son sustancias antioxidantes presentes en frutas como la granada (punicalagina y punicalina) y en madera de roble (grandinina) de donde pasan al vino que se envejece en barricas.



**Figura 7.** Estructura química del ácido tánico.

### **1.1.2. PROPIEDADES SENSORIALES Y SALUDABLES DE LOS ALIMENTOS QUE SE ASOCIAN A LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos presentes en los sustratos vegetales, frutas y productos derivados de éstos son responsables de muchas de las características sensoriales, nutricionales y saludables que caracterizan al producto final. Se ha descrito que estas sustancias participan en la formación del color, modulan el aroma a través de fenoles volátiles que se metabolizan por la microbiota presente de forma natural y confieren amargor, astringencia o acidez. Adicionalmente, sus propiedades antioxidantes son esenciales para la estabilidad de los alimentos y bebidas, así como también en sus efectos en la prevención de ciertas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Fleuriet y Macheix, 1998; Mahmood *et al.*, 2012).



El color de las frutas, verduras y sus derivados es producto de la presencia de los flavonoides denominados antocianos o antocianinas, los cuales dan lugar a las tonalidades rojas, azules y violetas características de las frambuesas, fresas, mirtilo, arándanos, cutícula de las ciruelas, uvas, litchis, entre otros (Macheix *et al.*, 1990; Shahidi y Naczk, 2004); adicionalmente las antocianidinas se han descrito en la cebolla, la berenjena y el rábano. El alto contenido fenólico del vino tinto se atribuye a la elevada concentración de antocianos junto con la presencia de catequinas y epicatequinas, siendo éstas sustancias responsables de casi el 50% del color granate de esta bebida (Ribéreau-Gayon, 1974). Los flavonoles pueden dar tonalidad amarillenta y crema a las frutas y hortalizas, siendo la quercitina es el principal flavonol presente en las cebollas. Los compuestos fenólicos también pueden ocasionar cambios no deseados en la coloración que incluyen el oscurecimiento y la pérdida de color. La presencia del ácido clorogénico en las patatas ocasiona el oscurecimiento del tejido del tubérculo después de su cocción (Shahidi y Naczk, 2004). La principal causa de alteración del color es la oxidación de las sustancias fenólicas y puesto que la pigmentación de los alimentos es esencial para la aceptación por parte del consumidor, esta característica sensorial tiene una gran importancia en la calidad final de los alimentos derivados de las frutas y vegetales (Manach *et al.*, 2004).

El aroma está fuertemente influenciado por la presencia de sustancias fenólicas volátiles. Algunos compuestos derivados de los ácidos cinámicos, como los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, sufren descarboxilación por la actividad de ciertos microorganismos formando sus 4-vinil derivados (4-vinil fenol y 4-vinil guayacol) que son compuestos aromáticos o intermediarios en la producción biotecnológica de nuevos aromas. Sin embargo, la subsiguiente reducción microbiana de éstos vinil fenoles a sus 4-etil derivados (4-etil fenol y 4-etil guayacol) da lugar a aromas que dependiendo del producto pueden ser considerados “off-flavours” (desagradables o indeseados) como en el caso de los vinos (Chattonnet, *et al.*, 1995), o característicos como en el caso de las cervezas “weissenbier” (cerveza blanca de trigo alemana) y “Belgian ales” (cerveza destilada) (Piškur *et al.*, 2012) y de ciertas salsas de origen oriental como la de soja (Yokotsuka, 1986; Shahidi y Naczk, 2004).

El carácter amargo o astringente de bebidas y alimentos es en gran parte debido a la presencia de flavonoles y taninos, respectivamente; mientras que la acidez se atribuye principalmente a los ácidos hidroxicinámicos y sus mezclas. Sin embargo, se ha descrito que el ácido *p*-cumárico en cantidades superiores de 45mg/Kg puede conferir sensación de amargo y astringencia. Las proantocianidinas, conocidas como taninos condensados, son dímeros, oligómeros y polímeros de las catequinas, responsables del carácter astringente de

las frutas (uvas, peras, manzanas) y bebidas (vino, sidra, cerveza y té), así como también del sabor amargo del chocolate (Manach *et al.*, 2004). Los cítricos contienen flavanonas como la naringina y neohesperidina que le confieren a estas frutas áidez o amargor dependiendo de las proporciones en las que se combinen. Las patatas, algunos tipos de manzanas, membrillos y los vinos son ejemplos característicos de alimentos astringentes y se ha descrito que la polimerización de los taninos puede ocasionar una reducción en la percepción de esta característica debido que los agregados interaccionan en menor medida con las proteínas de la saliva y se pierde la sensación de sequedad (Mehansho *et al.*, 1987; Shahidi y Naczk, 2004; Haslam, 2007).

En relación a sus propiedades nutricionales y beneficiosas para la salud, inicialmente los compuestos fenólicos se asociaron a efectos antinutricionales ya que en diversos estudios se observó su capacidad para precipitar proteínas, inhibir enzimas digestivas y afectar la absorción de las vitaminas y minerales, reduciendo de ésta forma el valor nutricional de los alimentos. Sin embargo, la información que se disponía a comienzos del año 2000 acerca de la biodisponibilidad y absorción de estas sustancias era diversa, fragmentada y controvertida (Shahidi y Naczk, 2004). Más recientemente, las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos se han reconocido y con ello, los estudios se han enfocado en evaluar los efectos antiinflamatorios, antiestrogénicos, cardio y neuroprotectores, antimutagénicos, entre otros (Fleuriet y Macheix, 1998; Kapur y Kapoor, 2001; Selma *et al.*, 2009). Los flavonoides exhiben una capacidad antioxidante muy elevada *in vitro* y son capaces de contrarrestar el efecto de ciertas especies reactivas como los superóxidos y los radicales hidroxil o peroxil, por lo que se les asocian propiedades antienvjecimiento. Por su parte, los taninos pueden inhibir la peroxidación lipídica y la actividad de lipooxigenasas (Halliwell *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2009) y los ácidos hidroxicinámicos presentan efectos beneficiosos frente a enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis (Manach *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2012; El-Seedi *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que el efecto beneficioso o antinutricional de los compuestos fenólicos depende de la cantidad consumida y de su biodisponibilidad, así como también del grado de transformación que experimenten a su paso por el tracto gastrointestinal (TGI) o durante su interacción con la microbiota que en dicho ambiente está presente.

El efecto de los taninos sobre ciertas bacterias patógenas que en un momento dado transitan por el intestino podría beneficiar en gran medida a los humanos. Algunas investigaciones en animales modelos indican que estas sustancias están involucradas en la distribución y abundancia de la microbiota intestinal. En roedores alimentados con una dieta

rica en polifenoles se ha observado que la población bacteriana predominante cambia de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Propionibacterium* spp. hacia *Bacteroides*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, incluyendo éstos dos últimos grupos especies descritas como probióticas (Dolara *et al.*, 2005).

Se han estudiado extractos de plantas herbáceas como el ginseng, la valeriana, la *ginkgo biloba*, el jengibre, entre otras, como fuentes potenciales de antioxidantes naturales que pueden contribuir a mejorar la inmunidad y disminuir el estrés oxidativo a escala celular, protegiendo de la oxidación de lípidos. A estas hierbas se le asocian propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antidepresivas y efectos hepato-protectores (Shahidi y Naczki, 2004; El-Hawary *et al.*, 2011).

## 1.2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN ALIMENTOS Y SUSTRATOS VEGETALES

Las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico (BAL) engloban una gran diversidad de microorganismos, asociados a numerosos alimentos, que son responsables de los cambios en el sabor, aroma, textura, color y acidez, entre otros, debido principalmente a la producción del ácido láctico. El concepto de “bacterias lácticas” data de principios del siglo XX y designa a un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, en forma de cocos o bacilos, catalasa negativas, sin presencia de flagelos o cilios y por lo tanto inmóviles, anaerobias aerotolerantes o microaerófilas, generalmente no formadoras de esporas y que producen ácido láctico como metabolito mayoritario de la fermentación de los azúcares (Stiles y Holzapfel, 1997). Las BAL incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus* y *Sporolactobacillus* (Madigan *et al.*, 2008). Un grupo importante de estas bacterias participan en la fermentación de sustratos vegetales o de origen animal y la fermentación espontánea realizada por muchas de las especies de estos grupos se ha utilizado durante siglos para aumentar la vida útil de diversos alimentos como los quesos, el yogur, la mantequilla, el chucrut (“sauerkraut”), los embutidos, las aceitunas o el pan, entre otros (Caplice y Fitzgerald, 1999). Está ampliamente documentado que la actividad biológica de las BAL permite obtener mejoras en las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos e incrementa su nivel de seguridad y calidad por la inhibición de la microbiota alterante o patógena (Caplice y Fitzgerald, 1999; Rodríguez *et al.*, 2009; Smid y Lacroix, 2012).

La fermentación láctica de vegetales tiene hoy día importancia desde el punto de vista industrial en productos como pepinos y pepinillos (donde se ha descrito la actividad de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*), repollo o col (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*), aceitunas de mesa (participando *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*), zanahorias, alcaparras (*Lactobacillus*), alcachofas, calabacines y berenjenas (*Lactobacillus*) (éstos últimos con menor impacto económico) (Gardner *et al.*, 2001).

La composición de la microbiota y su desarrollo son dos factores que afectan el curso de la fermentación y la calidad del producto, sobre todo en los casos donde el uso de cultivos iniciadores controlados no está extendido y la fermentación se realiza de forma espontánea. La fermentación espontánea involucra una variedad de microorganismos autóctonos y contaminantes que compiten por los nutrientes presentes en el sustrato y dependiendo de las condiciones del proceso (temperatura, pH, actividad de agua, disponibilidad de oxígeno, etc.), dominarán unas u otras especies (Madigan *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009). En los procesos espontáneos, el inicio de la fermentación puede llevar un tiempo considerablemente largo, además de poder ir acompañado de paradas en la degradación de los azúcares, lo que podría resultar en el deterioro del alimento y/o en la supervivencia de especies patógenas; por lo que se recomienda el uso de cultivos iniciadores que puedan garantizar la rápida acidificación del medio con la consiguiente inhibición de la microbiota acompañante y la calidad desde el punto de vista sanitario y sensorial (Gardner *et al.*, 2001).

Las bacterias lácticas forman parte de la microbiota autóctona de los sustratos de origen vegetal y predominan en las fermentaciones espontáneas de éstos alimentos. De todas las BAL, las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Pediococcus pentosaceus* se han identificado como las principales responsables de la fermentación de pepinos, coles, aceitunas, alcaparras y berenjenas de “Almagro”, siendo *L. plantarum* la especie utilizada con mayor frecuencia como cultivo iniciador (Gardner *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2009). Bebidas como el zumo de tomate o el vino y algunos tipos de cerveza se elaboran empleando algunas BAL como cultivos iniciadores o cultivos secundarios de la fermentación. Se ha descrito que cepas autóctonas de *L. plantarum* incrementan las propiedades sensoriales del jugo de tomate (Di Cagno *et al.*, 2009); mientras que para el caso de los vinos, es bien conocido que *Oenococcus oeni* es la principal bacteria utilizada como cultivo iniciador de la fermentación maloláctica, aunque también se encuentran otras bacterias como *L. brevis*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides* y *L. plantarum* (Moreno-Arribas *et al.*, 2003; Rodas *et al.*, 2005). Productos fermentados de menor popularidad en Europa como la mandioca (tapioca o yuca en Suramérica), el kimchi

coreano, los brotes tiernos de bambú, y ciertas bebidas a base de soja o arroz también se obtienen gracias a la acidificación llevada a cabo principalmente por las especies *L. plantarum*, *L. brevis* y *Leuconostoc mesenteroides* (Rodríguez *et al.*, 2009).

Comparando la diversidad de especies que forman parte de las bacterias lácticas con la microbiota que se ha observado en los sustratos vegetales fermentables es posible establecer que solo unas pocas especies parecen estar bien adaptadas para crecer en materiales orgánicos de origen vegetal donde los compuestos fenólicos son abundantes.

### **1.2.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, DIVERSIDAD Y VERSATILIDAD DEL GÉNERO *LACTOBACILLUS***

Los lactobacilos constituyen el grupo más importante de las bacterias lácticas. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y ocupan un gran número de nichos ecológicos, encontrándose generalmente en ambientes con una elevada concentración de carbohidratos (como p. ej. alimentos y sustratos derivados de plantas), pero también son capaces de ocupar el tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital de diversos animales y el hombre.

El género *Lactobacillus* se ha estudiado extensivamente, inicialmente debido a su importancia en la producción de alimentos y más recientemente, por el creciente conocimiento de su presencia y actividad en la microbiota humana, así como también por incluir especies que podrían ser usadas como probióticos, “microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio en la salud del hospedador” (<http://www.who.int>).

Los *Lactobacillus* están dentro del filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y familia Lactobacillaceae. Con el uso de las técnicas de biología molecular, la taxonomía de los lactobacilos ha experimentado diversos cambios. En el momento de realizar este estudio, según la “List of Bacterial Names with Standing Nomenclature” (Euzéby, 2013), el género *Lactobacillus* consistía en 185 especies y 28 subespecies. Este grupo bacteriano se caracteriza por ser homofermentativo mayoritariamente y presentar una mayor resistencia a los ambientes ácidos que el resto de las BAL, siendo capaces de crecer bien a valores de pH de 4-5 (Madigan *et al.*, 2008; Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011).

Muchas especies de *Lactobacillus* están altamente especializadas y se encuentran en un número limitado de hábitats, como es el caso de *L. delbrueckii*, la cual está adaptada a los ambientes donde está presente la leche (lecherías, fábricas de quesos, yogures) por lo que se utiliza ampliamente en la elaboración del yogur. Otras como *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L.*

*reuteri* y *L. rhamnosus* son habitantes del TGI y se ha extendido su uso como bacterias probióticas (Siezen y Wilson, 2010; Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). Sin embargo, especies como *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. hilgardii* y *L. plantarum*, están presentes en un amplio rango de ambientes y sustratos que incluyen alimentos cárnicos, vegetales y derivados lácteos, así como también residuos industriales, material orgánico de origen vegetal en descomposición y hasta el TGI de los mamíferos.

#### 1.2.1.1. *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

La especie *L. plantarum* es heterofermentativa (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011), se ha descrito como altamente versátil por cuanto es capaz de adaptarse exitosamente a diferentes ambientes y en la actualidad está incluida dentro de los microorganismos modelo en el estudio de las BAL con una diversidad fenotípica muy elevada. Representa el cultivo iniciador comercial usado con mayor frecuencia en la fermentación controlada de vegetales y se ha descrito como una de las especies que dominan en la mayoría de los procesos espontáneos que permiten la obtención de aceitunas, pepinos, pepinillos, coles o chucrut y berenjenas (Rodríguez *et al.*, 2009).

Aunque los compuestos fenólicos presentes en las plantas son tóxicos y bacteriostáticos para un gran número de microorganismos, *L. plantarum* se ha adaptado a la presencia de estas sustancias y posee rutas metabólicas para su degradación. Desde el punto de vista filogenético, está estrechamente relacionada con *L. paraplantarum*, *L. pentosus* y una especie de reciente identificación denominada *L. fabifermentans* (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). *L. paraplantarum*, *L. pentosus* y *L. plantarum* comparten un perfil similar de asimilación de carbohidratos y un 99% de similitud en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S que hace difícil su identificación por esta vía (Bringel *et al.*, 2005; Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). Las tres especies se incluyen en el denominado “grupo *L. plantarum*” y mediante técnicas moleculares se ha logrado diferenciarlas por la secuencia del gen *recA* y de la secuencia de la región intergénica espaciadora (IGS) entre los genes que codifican los ARNr 16S y 23S (Torriani *et al.*, 2001). *L. plantarum* también se ha utilizado como probiótico y en la última década se ha observado un incremento en el número de estudios destinados a conocer los efectos beneficiosos en la salud humana de diversas cepas de esta especie que incluyen a *L. plantarum* WCFS1, 299v, LA318 y DMS9843 (Connelly, 2008).

La secuencia del genoma de un organismo permite realizar estudios a escala molecular. Actualmente es posible acceder a la totalidad de la secuencia del genoma de tres

cepas de *L. plantarum*: WCFS1 (aislada de saliva humana), JDM1 (aislada de granos almacenados en silos) y ST-III (aislada a partir de una fermentación espontánea del kimchi), las cuales se encuentran depositadas en la base de datos del EMBL/GenBank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). Los tamaños del genoma de todas estas cepas superan los 3,1 millones de bases (Mb) siendo el de *L. plantarum* WCFS1 el de mayor tamaño con 3,3 Mb en el cromosoma, más tres plásmidos de 1,9, 2,3 y 36,1 kilobases (kb) (No. de acceso AL935263.2).

La capacidad de adaptación y flexibilidad de *L. plantarum* para habitar en diferentes ambientes se ha relacionado con el gran tamaño de su genoma y la presencia de genes que codifican numerosas proteínas involucradas en el metabolismo de azúcares y otras tantas descritas como reguladoras. Se ha descrito que el crecimiento de *L. plantarum* WCFS1 en diferentes fuentes de carbono está facilitado por la presencia de al menos 25 complejos Enzima II del sistema fosfoenolpiruvato/fosfotransferasas (PTS II), así como también por varios complejos PTS incompletos y de otras 30 proteínas involucradas en el sistema de transporte de carbohidratos. Además, los genes que codifican proteínas transportadoras están usualmente organizados en “cassettes” de expresión agrupados con los genes que codifican proteínas reguladoras y enzimas que participan en la degradación y asimilación de azúcares (Kleerebezem *et al.*, 2003; Siezen *et al.*, 2012). Adicionalmente, se han descrito más de 160 genes organizados en operones que codifican probables proteínas extracelulares, que en su mayoría están asociadas a la superficie externa de las células por su unión con componentes de la envoltura o pared celular (Zhou *et al.*, 2010). Estas proteínas denominadas CscA, CscB, CscC y CscD posiblemente forman un complejo con las proteínas de la superficie y desempeñan un papel en la adquisición de fuentes de carbono. Como estos genes principalmente están presentes en bacterias Gram-positivas asociadas a plantas, se cree que participan en la utilización de los oligo o polisacáridos de estos sustratos, así como también en la interacción de la bacteria con el medio ambiente (Siezen *et al.*, 2006; Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011).

*L. plantarum* WCFS1 parece poseer en su genoma regiones específicas (como por ejemplo en la zona que va desde 3,0 a 3,3 Mb) que al compararlas con las regiones equivalentes de otras cepas resultan con un contenido menor de GC y con una composición atípica en la proporción G+C de su ADN (Kleerebezem *et al.*, 2003). La diversidad genética de 20 cepas de *L. plantarum* aisladas de diferentes fuentes (vegetales, maíz, col ácida, saliva, intestino, colon y heces de humanos, forraje ensilado, ogi fermentado, mandioca agria y leche) se estudió mediante el uso de micromatrices de ADN en las que se empleó el genoma

de la cepa WCFS1 como patrón para el diseño de los oligonucleótidos o sondas (Molenaar *et al.*, 2005). La variación que se detectó respecto a la presencia de un grupo de genes coincidió con lo descrito por Kleerebezem *et al.* (2003) y llevó a proponer que en el cromosoma de *L. plantarum* existe una zona, que se ha designado como “life-style”, donde se localizan diversos genes que de forma específica participan en la respuesta frente a los cambios que ocurren en los diferentes ambientes donde esta bacteria se desarrolla (Molenaar *et al.*, 2005; Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011) y aunque esta hipótesis todavía no se ha demostrado, un estudio mediante un ensayo de hibridación genómica comparativa (CGH) que comparó 41 cepas de *L. plantarum*, indicó que entre el 9% y 20% de los genes presentes en el genoma de la cepa WCFS1 (cerca de 50 genes que se ubican en la región 3,07-3,28 Mb) están ausentes en las restantes 40 cepas que se analizaron (Molenaar *et al.*, 2005; Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011); y podrían ser los responsables de la versatilidad y flexibilidad observada en esta cepa.

### **1.3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESPUESTA Y ADAPTACIÓN DE LAS BACTERIAS CON SU ENTORNO**

Los estudios de la influencia que ejerce el ambiente en el cual se desarrolla un microorganismo se han enfocado tradicionalmente en evaluar los cambios en la viabilidad del cultivo, morfología celular, velocidad de crecimiento, coloración y morfología de las colonias o micelios y pérdida de actividad o cambios en el patrón de degradación de azúcares y otros sustratos (Holden y Utech, 1967; Manderson y Doelle, 1972; Horman *et al.*, 1981; Casadei *et al.*, 2001). Con el desarrollo de la microscopía electrónica y de las técnicas de inmunohistoquímica fue posible realizar el seguimiento de la movilización de moléculas en el espacio intracelular y extracelular, así como también descifrar ciertas modificaciones postraduccionales en las proteínas (Marchesi, 1968; Bron, 1970; Kostrzynska *et al.*, 1991; Almenoff *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 2003).

Sin embargo, a pesar de avanzar en el entendimiento de la respuesta celular frente a un estímulo dado, los mecanismos de tolerancia y adaptación producto de la interacción de los microorganismos con su entorno son muy complejos y de cara a los cambios ambientales, las células pueden responder alterando de forma simultánea la síntesis de cientos de proteínas e incrementando o reprimiendo múltiples rutas metabólicas a la vez. Las limitaciones de los estudios bajo el enfoque “un estímulo-una respuesta” se han superado con el desarrollo de



novedosas técnicas que permiten observar numerosos cambios al mismo tiempo a escala proteómica y transcriptómica.

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas de un organismo (en particular de su estructura y función) en determinadas condiciones. En los estudios proteómicos se realiza una comparación sistemática del proteoma en diferentes situaciones metabólicas con la finalidad de correlacionar las alteraciones en la síntesis de ciertas proteínas con determinados estadios fisiológicos. Los resultados de los estudios proteómicos ofrecen menor información al comparar con los estudios transcriptómicos, sin embargo, son la alternativa a elegir cuando no se dispone de la secuencia completa del genoma del microorganismo de interés.

En transcriptómica se evalúa el nivel de expresión de los genes o lo que es igual, la porción del ADN que se transcribe a ARN bajo unas condiciones dadas. Las técnicas para analizar el nivel de expresión génica como el Northern Blot y la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) permiten el estudio de un número limitado de genes de forma simultánea; mientras que las micromatrices de ADNc facilitan el análisis de la expresión de miles de genes determinando con elevada precisión el número relativo de copias del ARNm en una población celular bajo unas condiciones dadas. Las micromatrices también son conocidas como “microarray”, “chips de ADN” o “biochips” y consisten en adherir o unir a un soporte fragmentos cortos de pares de bases o sondas (oligonucleótidos o “probes”) cuya secuencia es complementaria a fragmentos de ADN presentes en cada uno de los genes del genoma de un organismo. Cuando la muestra o “target”, el ADN o ADNc, se coloca sobre el soporte y se permite que la hibridación tenga lugar bajo condiciones rigurosas, el acoplamiento “sonda-target” se detecta y cuantifica generalmente con la participación de un marcador fluorescente o quimioluminiscente, pudiéndose determinar la cantidad relativa de las secuencias de ácido nucleico contenidas en la muestra.

El muestreo a gran escala de la expresión génica mediante técnicas de hibridación en plataformas de micromatrices permite evaluar de forma multifactorial las respuestas que se derivan de los cambios en el medio ambiente en el que se desarrolla un organismo (recursos, sustancias tóxicas, pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno, nitrógeno, carbono, entre muchos otros).

Las bacterias presentes en los alimentos se enfrentan a diversas fuentes de estrés, algunas son propias del alimento donde ellas habitan mientras que otras se derivan del tránsito a través del TGI una vez son ingeridas. A diferencia de muchas especies para las cuales el ambiente estomacal ya es intolerable, las bacterias lácticas se exponen al bajo pH del

estómago, así como también a las sales biliares secretadas en el espacio intestinal y logran sobrevivir. Numerosos estudios se han realizado con la finalidad de conocer la respuesta y los mecanismos de tolerancia y adaptación que han desarrollado ciertas especies de la microbiota intestinal en estos ambientes, observándose avances importantes en el conocimiento a partir del uso de las técnicas moleculares.

Entre los primeros intentos realizados con la especie *L. plantarum* para evaluar la expresión simultánea de varios genes frente a un estrés del ambiente intestinal se encuentran los estudios realizados por Bron *et al.* (2004a), en donde mediante una librería genética de complementación se identificaron 31 genes cuya expresión se inducía en presencia de 0,1% de bilis de origen porcino. Los altos niveles de expresión de los genes *lp\_0237* (que codifica una proteína integral de membrana), *lp\_0775* (que codifica la arginino succinato sintasa) y de diversos genes que codifican proteínas de membrana (proteínas exportadoras, transportadores multidrogas, entre otras), se confirmaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real y se determinó que *lp\_0237* y *lp\_0775* se expresaban en niveles equivalentes, tanto en células de *L. plantarum* creciendo en un medio de cultivo suplementado con bilis, como en células de esta especie aisladas de duodeno de ratones. Este hallazgo constituyó una de las primeras descripciones sobre la similitud que se presenta entre las respuestas y los mecanismos de regulación que se observan en ensayos *in vitro* al comparar con la situación *in vivo*.

A partir de la secuenciación completa del genoma de diversas especies de *Lactobacillus* se observó un incremento en el número de investigaciones que han utilizado los soportes o micromatrices de ADNc para evaluar el efecto que a nivel transcripcional ocasiona la presencia de una sustancia o los cambios en las condiciones ambientales tales como temperatura, pH y osmolaridad. Particularmente en la especie *L. plantarum* WCFS1 se ha estudiado el efecto del ácido láctico y el pH (Pieterse *et al.* 2005); así como también de la presencia de ácidos biliares (Bron *et al.*, 2006); de fructo-oligosacáridos de cadena corta descritos como prebióticos (Saulnier *et al.*, 2007) y del peróxido de hidrógeno (Serrano *et al.*, 2007).

Whitehead *et al.* (2008) estudiaron bajo un enfoque transcriptómico, los cambios ocasionados en la expresión génica de la cepa probiótica *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 habitante natural del TGI de muchos mamíferos, cuando en el medio de crecimiento se añaden sales biliares. El análisis indicó que los genes que alteran su expresión intervienen el metabolismo y transporte de sustratos. Estudios similares para evaluar los efectos de la temperatura sobre *Streptococcus thermophilus* (Li *et al.*, 2011) describen la inducción de genes asociados a la respuesta general de choque térmico (*dnaK*, *groESL* y *clpL*); así como

también de genes que codifican reguladores transcripcionales (*hrcA*, *ctsR*, *fur*, *marR* y *merR*) y relacionados con la pared celular, transducción de señales, homeostasis y transportadores del tipo ABC (“ATP binding cassette”).

Las micromatrices de ADNc también se han utilizado para investigar el metabolismo primario de asimilación de carbohidratos en *Lactobacillus sakei*. Al comparar los niveles de transcripción de los genes cuando esta especie se desarrolla en un medio con ribosa en lugar de glucosa, se ha establecido que los mecanismos reguladores realizan ajustes muy finos en la expresión de genes responsables de la síntesis de enzimas que controlan el aprovechamiento eficiente de las fuentes de carbono y que participan en el metabolismo y transporte de carbohidratos (McLeod *et al.*, 2011).

Recientemente, van Bokhorst-van de Veen *et al.* (2011) evaluaron la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 en presencia de etanol determinando que la exposición a concentraciones cercanas al 8% ocasionan la inducción de la expresión de un grupo de genes relacionados con el metabolismo del citrato y con la arquitectura de la cubierta celular, así como también de los genes de respuesta general al estrés que están bajo el control de los reguladores HrcA y CtsR.

La tabla II presenta un resumen de los estudios de expresión génica mediante micromatrices de ADN y ADNc que se han realizado en la última década en diversas especies de *Lactobacillus* presentes en alimentos o en sus procesos de fabricación.

Inicialmente las investigaciones se enfocaron en evaluar el efecto de ciertos ácidos orgánicos como el láctico y de las sales biliares, en un intento lógico de dilucidar los múltiples mecanismos que estas bacterias despliegan durante su permanencia en dos de los principales ambientes donde ellas se desarrollan: los productos fermentados de la leche y el TGI. Posteriormente el abanico de posibilidades se abrió y en la actualidad gran parte de los estudios están orientados a profundizar en el conocimiento de los genes inducidos en organismos *in vivo* (denominados genes *ivi*; *In Vivo*-Induced), en la interacción células hospedador-bacteria y en la interacción bacterias probióticas-patógenas.

Hasta la fecha no se han realizado estudios globales mediante análisis transcriptómicos orientados a evaluar el efecto que sobre las BAL ocasionan los compuestos fenólicos presentes en los sustratos vegetales en los que ellas habitan de forma natural y que forman parte de nuestra dieta. Debido a esto, el conocimiento relacionado con los mecanismos de tolerancia y adaptación que activan estos microorganismos en presencia de los ácidos fenólicos, flavonoides o estilbenos es muy limitado y se centra principalmente en los efectos que de forma puntual se observan sobre el crecimiento, la viabilidad, el consumo de glucosa y la producción de biomasa de la población celular.

**Tabla II.** Estudios de expresión génica mediante micromatrices de ADN en diversas especies de *Lactobacillus* presentes en alimentos o en sus procesos de fabricación.

| Especie                         | Gen/Proteína <sup>a</sup>  | Descripción   | Interés biológico  | Referencia  |
|---------------------------------|--|---|--|---|
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    |  | Exposición a ácido láctico  | Respuesta global al ácido láctico  | Pieterse <i>et al.</i> , 2005.  |
| <i>L. paracasei</i><br>1195     | fructosa/ manosa PTS,<br>$\beta$ -fructosidasa<br>operón <i>fos</i>                  | Cultivos con glucosa vs.<br>fructo-oligosacáridos (FOS)   | Metabolismo de fructo-<br>oligosacáridos (FOS)   | Goh <i>et al.</i> , 2006.   |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | operón <i>metC-cysK</i> ,<br>operón <i>dlt, ftsH</i>                                 | Exposición a bilis porcina  | Respuesta global al<br>estrés causado por ácidos<br>biliare  | Bron <i>et al.</i> , 2006.  |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | <i>lp_2940, lp_3055,</i><br><i>lp_1164</i>   | Supervivencia de cepas<br>mutantes en los genes <i>ivi</i> <sup>b</sup><br>( $\Delta lp_2940, \Delta lp_3055,$<br>$\Delta lp_1164$ )            | Persistencia y supervivencia<br>en el TGI  | Bron <i>et al.</i> , 2007;<br>Marco <i>et al.</i> , 2007.               |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | sacarosa PTS,<br>$\beta$ -fructo furanosidasa  | Cultivos con glucosa vs.<br>fructo-oligosacáridos (FOS)<br>de cadena corta  | Metabolismo de fructo-<br>oligosacáridos (FOS)   | Saulnier <i>et al.</i> , 2007.  |
| <i>L. reuteri</i><br>ATCC 55730 |  | Crecimiento en “sourdough”<br>y en medio mínimo   | Mecanismos de adaptación<br>frente a la masa fermentada<br>de centeno  | Hüfner <i>et al.</i> , 2008.  |
| <i>L. reuteri</i><br>ATCC 55730 | <i>clpE, clpE, dps,</i><br><i>lr1516, lr1265, lr1584</i>                             | Exposición a bilis bovina   | Respuesta global al estrés<br>causado por sales biliares   | Whitehead <i>et al.</i> ,<br>2008.                                      |
| <i>L. reuteri</i><br>JCM1112    | <i>lreu_0293,</i><br><i>lreu_1553, lreu_1792</i>                                     | Crecimiento en ausencia y<br>presencia de cisteína  | Síntesis de vitamina B12   | Santos <i>et al.</i> , 2009.  |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | Factor de transcripción<br>Sigma <sup>54</sup><br><i>rpoN</i> , operón manosa<br>PTS | Crecimiento en manosa,<br>galactosa vs. glucosa.<br>Cambios en el mutante<br>$\Delta rpoN$ y $\Delta pts9ABCDC$                                 | Transporte y metabolismo de<br>manosa y otros carbohidratos  | Stevens <i>et al.</i> , 2010.   |
| <i>L. sakei</i> 23K             | <i>hprK, PTS I</i>   | Crecimiento en glucosa vs.<br>ribosa  | Metabolismo de ribosa  | McLeod <i>et al.</i> , 2011.  |
| <i>L. acidophilus</i><br>NCFM   | <i>lacS</i> (permeasa)   | Crecimiento en glucosa vs.<br>sacarosa, fructosa, lactosa,<br>trehalosa y rafinosa.<br>Cultivos con glucosa vs.<br>galacto-oligosacáridos (GOS) | Metabolismo de azúcares.<br>Genes del metabolismo de<br>galacto-oligosacáridos (GOS)                         | Barrangou <i>et al.</i> ,<br>2006;<br>Andersen <i>et al.</i> ,<br>2011. |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | <i>ctsR, hrcA</i>  | Exposición a etanol a<br>diferentes tiempos (10 min,<br>30 min y 24 h)  | Respuesta global al estrés<br>causado por etanol   | van Bokhorst-van de<br>Veen <i>et al.</i> , 2011.                       |
| <i>L. brevis</i><br>ATCC367     | Síntesis de ácidos<br>grasos, factor sigma   | Exposición a ácido ferúlico y<br>n-butanol  | Producción de<br>biocombustibles   | Winkler y Kao,<br>2011.   |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | Factor de transcripción<br>Sigma <sup>70</sup>                                       | Predecir la presencia del<br>factor Sigma <sup>70</sup> involucrado<br>en la transcripción de genes<br>“housekeepng”                            | Inferir los sitios de inicio de<br>la transcripción  | Todt <i>et al.</i> , 2012.  |
| <i>L. acidophilus</i><br>L-92   | GroES, GroEL   | Efecto del pH en la expresión<br>génica global  | Componentes celulares claves<br>en respuesta a las variaciones<br>de pH                                      | Kuwana y<br>Yamamoto, 2012.   |
| <i>L. casei</i><br>Zhang        | Sistema PTS,<br>genes <i>pyr/pur</i>   | Efecto de los jugos gástricos<br>e intestinal   | Viabilidad y supervivencia en<br>el TGI  | Wang <i>et al.</i> , 2012.  |
| <i>L. reuteri</i><br>100-23     | <i>luxS</i>  | Supervivencia de cepas<br>mutantes $\Delta luxS$  | Papel del gen <i>luxS</i> en el<br>metabolismo   | Charlotte <i>et al.</i> ,<br>2012.                                      |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | Genes<br><i>tag, tarIJKL</i>   | Genes <i>tag</i> y <i>tar</i> involucrados<br>en la síntesis del ácido<br>teicoico de pared   | Papel de los componentes de<br>la pared celular en la<br>fisiología e interacciones<br>probiótico-hospedador | Bron <i>et al.</i> , 2012.  |
| <i>L. plantarum</i><br>WCFS1    | <i>srtA</i>  | Papel de las sortasas<br>(transpeptidasas ancladas a la<br>membrana celular)  | Interacción bacterias<br>patogénicas/No patogénicas<br>con el hospedador                                     | Remus <i>et al.</i> , 2013.   |

<sup>a</sup> Genes o proteínas de interés<sup>b</sup> Genes *ivi*: genes inducidos en organismos *in vivo* (*In Vivo*-Induced)

#### 1.4. EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL CRECIMIENTO Y VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Se ha comentado en apartados anteriores que los microorganismos asociados a las plantas están bajo la influencia o presión de los compuestos fenólicos que se encuentran en los vegetales. El número de estudios sobre el efecto de tales compuestos en la viabilidad, crecimiento y fisiología de las bacterias lácticas se ha incrementado en las dos últimas décadas y como se expone a continuación, el tipo y magnitud de la alteración que ocasionan es en gran medida especie-específico y en muchos casos cepa-específico.

En el pasado las investigaciones se centraron en los efectos de tales sustancias en diversas especies presentes en vinos como *O. oeni*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *L. brevis*. Vivas *et al.* (1997) estudiaron el efecto de los ácidos fenólicos y las antocianinas en *O. oeni* (anteriormente *Leuconostoc oenos*) concluyendo que el ácido gálico y las antocianinas activaban la tasa de crecimiento celular y de degradación del ácido málico. El ácido vanilínico mostró un ligero efecto inhibitorio en el crecimiento mientras que el ácido protocatéuico no ejerció ningún efecto. Posteriormente se describió que los taninos de la uva, las procianidinas, y los taninos de la madera de roble, los elagitaninos, no ejercían los mismos efectos en *O. oeni* y demostraron que los elagitaninos cuando se oxidan potencian la disminución del crecimiento, contrario a lo observado para las procianidinas que al oxidarse pierden su capacidad de inhibirlo. Los autores sugieren que el mecanismo implicado en este fenómeno puede ser la adsorción del compuesto en la zona de la envoltura celular bacteriana (Vivas *et al.*, 2000). Salih *et al.* (2000) describieron que la tasa de crecimiento y la producción de biomasa de *O. oeni* decrecen en presencia de los ácidos cinámicos libres, sin embargo sus ésteres tienen poco o ningún efecto. En estudios equivalentes se observó que los efectos de los compuestos fenólicos dependen del tipo y la concentración de éstos, mientras a bajas concentraciones generalmente no ejercen efectos, a concentraciones elevadas son inhibidores del crecimiento celular. La catequina y quercitina pueden estimular la fermentación maloláctica, mientras que se observa un retraso en ésta a medida que se incrementa la concentración del ácido *p*-cumárico (Reguant *et al.*, 2000). Por su parte, el ácido gálico parece retrasar o inhibir la formación de ácido acético a partir de ácido cítrico en estudios donde *O. oeni* se cultiva en condiciones similares a las del vino. Se ha observado que cuando aumenta la fracción total de compuestos fenólicos se reduce la velocidad de consumo de los azúcares y aumenta el consumo de ácido cítrico (Reguant *et al.*, 2003). Campos *et al.* (2003)

describieron que los ácidos cinámicos influenciaban de manera más negativa el crecimiento de *O. oeni* que los ácidos benzoicos.

Alberto *et al.* (2001) estudiaron los efectos del ácido gálico y de la catequina en el crecimiento de *L. hilgardii* determinando que ambas sustancias, a las concentraciones que habitualmente están presentes en el vino, estimulan el crecimiento celular, el consumo de glucosa y fructuosa durante las primeras horas del crecimiento y la producción de biomasa durante la fase estacionaria. Sin embargo, se detectó una relación inversa entre la concentración total de compuestos fenólicos y la viabilidad de *L. hilgardii* 5w cuando se superan los 2000 mg/L de equivalentes de ácido gálico (EAG). Estudios adicionales empleando como sustrato de crecimiento vino decolorado (que carece de la fracción de taninos), demostraron que el recuento de células viables de *L. hilgardii* 5w se incrementaba con respecto al control sugiriendo que la unión de los taninos a la superficie bacteriana era la causa de la pérdida de viabilidad (Alberto *et al.*, 2002). Campos *et al.* (2003) describieron que el ácido *p*-cumárico ocasionaba una inhibición marcada en el crecimiento de esta especie aunque otros ácidos cinámicos como el cafeico y ferúlico lo potenciaban. Relacionado con los flavanoles presentes en el té verde y similar a lo observado para *O. oeni*, se ha descrito que la catequina y epicatequina no afectan considerablemente el crecimiento de la cepa *L. hilgardii* 5 aislada de vino (Figueiredo *et al.*, 2008); sin embargo, el primer compuesto es capaz de afectar el crecimiento de otra cepa de *L. hilgardii* productora de putrescina (cepa X<sub>1</sub>B) y crecida en medio mínimo suplementado con 7% de etanol (Alberto *et al.*, 2007). En este estudio se estimuló el crecimiento de *L. hilgardii* X<sub>1</sub>B mediante la adición de tres ácidos fenólicos (cafeico, protocatéquico y vanílico) y dos flavonoides (catequina y rutina), sin embargo, el ácido gálico y la quercetina no ejercieron ningún cambio. Relacionado con el metabolismo de la glucosa y de los ácidos orgánicos, se ha descrito que los ácidos fenólicos (hidroxicinámicos y el protocatéquico, excluyendo el ácido gálico,) reprimieron en *O. oeni* VF y *L. hilgardii* 5 el metabolismo de la glucosa y del ácido cítrico; mientras que los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico incrementaron la producción de los ácidos acético y láctico a partir de la glucosa (Campos *et al.*, 2009a) únicamente en la primera especie. Adicionalmente, los tres ácidos hidroxycinámicos alteraron en mayor medida el flujo de protones hacia el interior de las células y la pérdida de iones como el potasio o fosfato que lo descrito en el caso de los ácidos gálico, protocatéquico, vanílico y sirínico (Campos *et al.*, 2009a).

En *Lactobacillus collinoides* y *L. brevis* se evaluó el efecto de los ácidos gálico, clorogénico y quínico a concentraciones de 100, 500 y 1000 mg/L observándose que los tres ácidos a las tres concentraciones utilizadas estimularon únicamente el crecimiento de *L.*

*collinoides* durante las fases tempranas del desarrollo; mientras que durante la fase estacionaria, tanto el ácido gálico como el clorogénico ocasionaron un incremento en la producción de biomasa de ambos lactobacilos (Stead, 1994). Puupponen-Pimiä *et al.* (2001) estudiaron las propiedades antimicrobianas de diversos ácidos fenólicos (cafeico, ferúlico y *p*-cumárico), antocianidinas (pelargonidinas, delfinidina), flavonas (apigenina y luteolina), flavanoles (catequina) y flavonoles (kaempferol, quercetina, miricetina y rutina) presentes en frutos rojos (arándanos, bayas, frambuesas), frente a varias cepas de *Lactobacillus* descritas como probióticas o aisladas del TGI, determinando que únicamente la miricetina fue capaz de inhibir el crecimiento de *L. rhamnosus* (cepas E-800 y ATCC 53103), *L. reuteri* ATCC 55730, *L. paracasei* E-510 y *L. crispatus* M247. Por su parte *L. plantarum* WCFS1 no se vió afectado por ninguno de los compuestos evaluados a las concentraciones que normalmente se presentan en estos frutos.

Se ha observado que el crecimiento de las bacterias lácticas se reprime durante la elaboración de aceitunas de mesa, particularmente de la variedad Manzanilla. Esta actividad inhibitoria se atribuyó inicialmente a la presencia del glucósido amargo oleuropeína, presente en la pulpa de estos frutos; sin embargo, posteriormente se demostró que los productos de su hidrólisis, el ácido elenólico y la aglicona de la oleuropeína, ejercían una actividad antimicrobiana mayor a la del propio glicósido (Fleming, *et al.*, 1973). Más recientemente se describió que el componente principal en las salmueras de aceitunas es el polifenol hidroxitirosol, seguido por el tirosol y la oleuropeína; exhibiendo el primero una elevada actividad bactericida frente a las bacterias lácticas. Medina *et al.* (2007) investigaron el efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos y oleosídicos presentes en salmueras de aceitunas de la variedad citada sobre *L. pentosus* ATCC8041 concluyendo que ni el hidroxitirosol ni la oleuropeína (ésta última incluso a concentraciones tan altas como 8mM), presentaron actividad inhibitoria frente a esta cepa.

Guzmán-López *et al.* (2009) evaluaron el efecto del ácido gálico en 18 cepas de bacterias lácticas aisladas de pulpa de café procedente de residuos industriales que incluían las especies *Lactobacillus buchneri*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *P. pentosaceus*. Los cultivos se analizaron empleando un medio suplementado con el ácido fenólico a dos concentraciones (2 y 10 g/L) y los resultados observados fueron diversos. A la concentración más baja no se observó inhibición en el crecimiento en un total de 15 de los aislados, y de éstos, solo dos metabolizaron el ácido gálico. Por otra parte, disminuyó el crecimiento de las cepas *P. pentosaceus* L-20 y *L. plantarum* Nat-38 a pesar de que éstos aislados si consumieron el ácido gálico.

García-Ruíz *et al.* (2009) realizaron un estudio más amplio sobre el efecto de diversos compuestos fenólicos presentes en el vino (como ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos, estilbenos, flavanoles y flavonoles), en el crecimiento de dos cepas de BAL aisladas de vino tinto durante las fases tempranas de la fermentación maloláctica. Los resultados permitieron concluir que es improbable que éstos compuestos a las concentraciones que se presentan en el vino puedan afectar por sí solos el crecimiento de las cepas *L. hilgardii* IFI-CA 49 y *P. pentosaceus* IFI-CA 85, aunque no descartan la posibilidad de que ocurran efectos sinérgicos entre éstos y ciertas condiciones propias del ambiente de las bodegas. Tabasco *et al.* (2011) estudiaron el efecto de un extracto comercial de semillas de uva (GSE) enriquecido en flavanoles (catequina, epicatequina y sus polímeros procianidinas) sobre varias cepas de bacterias lácticas observando cierta inhibición en el crecimiento de las especies *L. plantarum*, *L. casei* y *L. bulgaricus*. Este efecto inhibitorio del extracto GSE se atribuyó a la elevada proporción de compuestos derivados del galato tales como (-)-epicatequina-3-O-galato y parece ser un carácter especie-específico, aunque para el caso de *L. plantarum* se observó especificidad relacionada con la cepa.

La actividad antimicrobiana de los ácidos fenólicos se incrementa a valores bajos de pH. Sánchez-Maldonado *et al.* (2011) evaluaron el efecto del pH sobre las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de los ácidos protocatéquico, cafeico, ferúlico y *p*-cumárico en las cepas *L. plantarum* TMW aislada de cerveza y *L. hammesii* DSM 16381 aislada de masa fermentada (“sourdough”) observando que a valores de pH menores a 5,5 el efecto sinérgico entre el compuesto y la acidez del medio se potenciaba dando como resultado una disminución en los valores MIC para ambas bacterias.

El efecto tóxico de los taninos sobre el crecimiento de diversos microorganismos que incluyen mohos, levaduras y bacterias se estudió ampliamente en la década de los años 80 y 90 (para una revisión detallada consultar Scalbert, 1991), llegando a proponerse diversos mecanismos de destoxificación y biodegradación. Sin embargo, a pesar de realizarse investigaciones en diversas cepas de bacterias de origen intestinal, solo se consideró a la especie *L. acidophilus* (Chung *et al.*, 1998). Los estudios más recientes incluyen un amplio número de especies de BAL y reflejan alteraciones marcadas en la viabilidad celular. La sensibilidad al ácido tánico parece ser cepa-específica, así, el crecimiento de *L. acidophilus* ATCC 4356 resulta inhibido a concentraciones de 0,5-1 g/L (Chung *et al.*, 1998), mientras que la velocidad de crecimiento y producción de biomasa de cepas como *L. hilgardii* DSM 20176<sup>T</sup> se ven afectadas a concentraciones tan bajas como 0,1g/L (Bossi *et al.*, 2007).



Mediante estudios proteómicos se ha evaluado el efecto del ácido tánico en *L. hilgardii* DSM 20176<sup>T</sup>. Los resultados indican una disminución en la intensidad de los puntos (“spots”) a concentraciones de 1 g/L del compuesto, donde además se detecta una inhibición marcada del crecimiento. El perfil de tres proteínas se alteró tanto en presencia de ácido tánico a 0,1 g/L como a 1 g/L y éstas proteínas se identificaron mediante un análisis de espectrometría de masas como piruvato quinasa, galactosidasa y una reductasa NrdI de ribonucleótido (Bossi *et al.*, 2007).

Rivas-Sendra *et al.* (2011) evaluaron los cambios en las proteínas presentes en cultivos de *L. brevis* BL23 expuestos al ácido *p*-cumárico. De 11 proteínas que presentaron síntesis diferencial, seis se identificaron como: i) ClpP y HtrA, involucradas en el plegamiento y recambio de proteínas; ii) una carboxilasa de acetil-Coenzima A que participa en el metabolismo de lípidos; iii) arginil-ARNt sintetasa y iv) las enzimas PurL y PurN que forman parte de la ruta de biosíntesis de purinas. Este estudio constituye uno de los primeros enfoques realizados para dilucidar los múltiples mecanismos de tolerancia y adaptación que se activan frente a este ácido hidroxicinámico.

#### **1.4.1. INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN *L. PLANTARUM***

La participación de *L. plantarum* en la fermentación espontánea de alimentos como las aceitunas de mesa es indicativo de la capacidad que posee esta especie para contrarrestar en mayor medida los efectos tóxicos de las sustancias fenólicas que forman parte de estos sustratos vegetales. Whiting y Coggins (1971) estudiaron el efecto de ácido quínico en la cepa *L. plantarum* 13a observando una disminución leve en la biomasa final después de 48 horas. Posteriormente Salih *et al.* (2000) evaluaron las alteraciones que el ácido quínico, los ácidos hidroxicinámicos (AHC) y sus ésteres quínicos, ejercían en la velocidad de crecimiento y en la biomasa final de esta especie. Los resultados mostraron que el ácido quínico y los ésteres no eran activos y que sólo ocurría una aparente variación en la tasa de crecimiento en presencia de los AHC. Marsilio y Lanza (1998) describieron un efecto sinérgico entre el ácido *p*-cumárico y el cloruro de sodio sobre el crecimiento de *L. plantarum* B21 donde una concentración de 20g/L de NaCl en presencia de 1g/L del ácido produjo una reducción significativamente la viabilidad de dicha cepa.

El actividad de los ácidos fenólicos *p*-cumárico (Marsilio y Lanza, 1998), cafeico, ferúlico y de taninos como el ácido tánico (Rozès y Peres, 1998) en el crecimiento de *L. plantarum* depende de su concentración. Landete *et al.* (2007) describieron que la inhibición

del crecimiento por la presencia de 10 compuestos fenólicos frecuentes en los residuos de la industria del vino dependía de su estructura química siendo el orden de inhibición de estos compuestos catequina = ácido gálico < epicatequina galato = ácido salicílico < galato de metilo = ácido cafeico < ácido ferúlico < ácido *p*-cumárico. Por otra parte, la actividad antimicrobiana de algunos compuestos fenólicos presentes en productos como al aceite de oliva y las aceitunas, frente a cuatro cepas *L. plantarum*, CECT 748<sup>T</sup> (aislada de col fermentada), WCFS1 (aislada de saliva), LPT57/1 (aislada de aceitunas) y RM71 (obtenida de vino), fue similar para todas las cepas en el caso del ácido cinámico, *p*-hidroxibenzoico, oleuropeína, y tirosol; aunque se observan diferencias en la MIC del hidroxitirosol, ácido protocatéquico, sinápico y siríngico donde la cepa CECT 748<sup>T</sup> presentó la mayor resistencia a dichos compuestos (Landete *et al.*, 2008). Este estudio también demostró que ninguno de los compuestos fenólicos estudiados a las concentraciones que se presentan de forma natural en las olivas y los productos derivados de ellas son capaces de inhibir el crecimiento de este microorganismo.

Rozés y Peres (1998) estudiaron el efecto de los compuestos fenólicos en la composición lipídica de las células de *L. plantarum*. Cantidades crecientes de los ácidos cafeico y ferúlico provocaron un incremento gradual en la cantidad de los ácidos mirístico, palmitoleico y esteárico principalmente, alterándose la composición total de los ácidos grasos de forma similar a lo que sucede en respuesta a bajas temperaturas o altas concentraciones de etanol. La incorporación de ácidos grasos como el palmitoleico (C<sub>16:1</sub>) a la bicapa lipídica conduce al incremento en la fluidez de la membrana. En presencia del ácido tánico se observó un fenómeno opuesto siendo comparable al efecto que ocurre cuando se aumenta la temperatura de crecimiento.

Algunos autores han estudiado la influencia de la oleuropeína y los productos derivados de su hidrólisis en la supervivencia de *L. plantarum*. Juven y Henis (1972) observaron inhibición en el crecimiento y una salida significativa de glutamato, potasio y fosfato inorgánico que relacionaron con alteraciones en la membrana. Por otra parte, cuando la oleuropeína se añadió al cultivo en fase estacionaria de crecimiento la velocidad de la glucólisis no se vió afectada, sin embargo el contenido de ATP intracelular disminuyó. Posteriormente, Ruíz-Barba *et al.* (1990) evaluaron los efectos antimicrobianos de la fracción de compuestos fenólicos extraída de salmueras empleadas para la fermentación de aceitunas en 10 cepas de *L. plantarum* mediante técnicas de microscopía electrónica y microscopía de fluorescencia. Las microfotografías mostraron signos de degradación en la pared celular, con superficies de aspecto irregular y rugoso en una proporción alta de células y la adsorción de

las sustancias a la pared de aquellas células que aún permanecían completas. La adición de oleuropeína tratada por calor presentó efectos bactericidas y alteraciones equivalentes a lo descrito para los extractos totales, pero adicionalmente las bacterias perdieron su forma bacilar típica y presentaron reacción Gram-negativa frente a la tinción con cristal violeta (Ruíz-Barba *et al.*, 1991). La inhibición del crecimiento de *L. plantarum* por la oleuropeína se ha descrito que está asociada a la presencia de sus productos de hidrólisis (la aglicona de oleuropeína e hidroxitirosol) (Rozès y Peres, 1996) y en la actualidad se dispone un conocimiento limitado al respecto.

Los primeros estudios del efecto de los taninos hidrolizables sobre el crecimiento de las bacterias lácticas describen que este grupo bacteriano presenta una menor sensibilidad al compararlo con otras especies de la microbiota intestinal (Chung *et al.*, 1998). El crecimiento de *L. plantarum* es inhibido en presencia del ácido tánico a concentraciones de 1 g/L (Rozès y Peres 1998). Rodríguez (2009) estudió mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica de transmisión las alteraciones que en la membrana y pared celular se producían en *L. plantarum* CECT 748<sup>T</sup> en presencia de ácido tánico. A concentraciones superiores a 0,5 mM las células forman agregados debido a la unión de los taninos a las proteínas de la membrana o por una división incompleta de las células. Las microfotografías mostraron signos de degradación de la pared celular, con superficies irregulares y poca definición de la membrana, así como también la asociación ocasional de un material extracelular a la pared. En este estudio también se describió un aumento de la fase de latencia dosis dependiente y la ausencia del crecimiento cuando la concentración del ácido tánico superó valores de 1 mM.

Mediante estudios proteómicos se ha evaluado el efecto del ácido tánico en dos cepas de *Lactobacillus plantarum*, WCFS1 y VP08. Los estudios se realizaron con una concentración de 0,25 g/L en la cepa VP08 y de 1,70 g/L en WCFS1. Los resultados indican que la cepa VP08, aislada de vino, responde alterando los niveles de proteínas involucradas en la glicólisis, metabolismo de aminoácidos, traducción y plegamiento de proteínas (Cecconi *et al.*, 2009); mientras que en la cepa WCFS1, aislada del tracto digestivo superior, se observa la modificación en los niveles de la síntesis de proteínas relacionadas con la biogénesis de pared, defensa contra estrés oxidativo y ahorro de energía; así como también un incremento en la intensidad del “spot” correspondiente a la proteína Lp-2945 (subunidad C de la galato descarboxilasa) (Curiel *et al.*, 2011).

La revisión de la bibliografía que se ha publicado pone de manifiesto la necesidad de conocer los mecanismos de supervivencia que de forma particular han desarrollado algunas especies de bacterias lácticas frente a los compuestos fenólicos incluyendo los cambios en el

metabolismo que se han asociado a la presencia de estos compuestos en los sustratos vegetales.

### **1.5. METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN BACTERIAS LÁCTICAS**

Algunos microorganismos han desarrollado estrategias evolutivas para lograr adaptarse a ambientes que presentan altas concentraciones de compuestos fenólicos. En algunas ocasiones obtienen energía de estas sustancias y las utilizan como fuente de carbono tanto en ambientes aerobios, donde el oxígeno es el aceptor final de electrones, como en anaerobios, donde utilizan aceptores finales alternativos como los sulfatos, nitratos e iones de hierro. En otras ocasiones sólo ocurre la transformación de estos compuestos en otros menos tóxicos. Las rutas de biotransformación de los compuestos fenólicos son muy variadas e incluyen la actividad de monooxigenasas y dioxigenasas en ambientes aeróbicos, o formación de benzoil-Coenzima A para su posterior reducción si las condiciones son anaeróbicas (Díaz, 2004).

La presencia de bacterias lácticas en sustratos vegetales con un alto contenido de compuestos fenólicos refleja la capacidad que poseen estos microorganismos para destoxificar o transformar estas sustancias. Los procesos metabólicos de conversión que les permiten dicha tolerancia y supervivencia, están relacionados con una respuesta adaptativa al medio ambiente que les confiere ventajas competitivas frente a otros grupos bacterianos. De esta forma, ciertas especies de *Lactobacillus* son intrínsecamente más tolerantes a los ácidos fenólicos cuando se comparan con *E. coli* o *B. subtilis* (Wells *et al.*, 2005; Cueva 2010; Sanchez-Maldonado *et al.*, 2011).

Los estudios relacionados con el metabolismo de los compuestos fenólicos por las BAL son escasos y se han realizado en *O. oeni*, *P. pentosaceus* y unas pocas especies de *Lactobacillus*. Whiting y Carr (1957) describieron que durante el proceso de fermentación de la sidra se observaba la desaparición del ácido clorogénico. El primer paso en la degradación de este ácido se demostró empleando extractos celulares de *Lactobacillus paracollinoides* (antiguamente denominado *L. pastorianus* var. *quinicus*) que hidrolizaron el ácido clorogénico en ácido cafeico y quínico (Whiting y Carr, 1957). Más tarde se describió que el ácido cafeico se metabolizaba a ácido dihidrocafeico (ácido propiónico 3- [3-4-dihidroxifenil]) y etil catecol (Whiting y Carr, 1959). *L. paracollinoides* también fue capaz de reducir la cadena lateral de los ácidos 3-hidroxicinámico y 3,4-dihidroxicinámico y

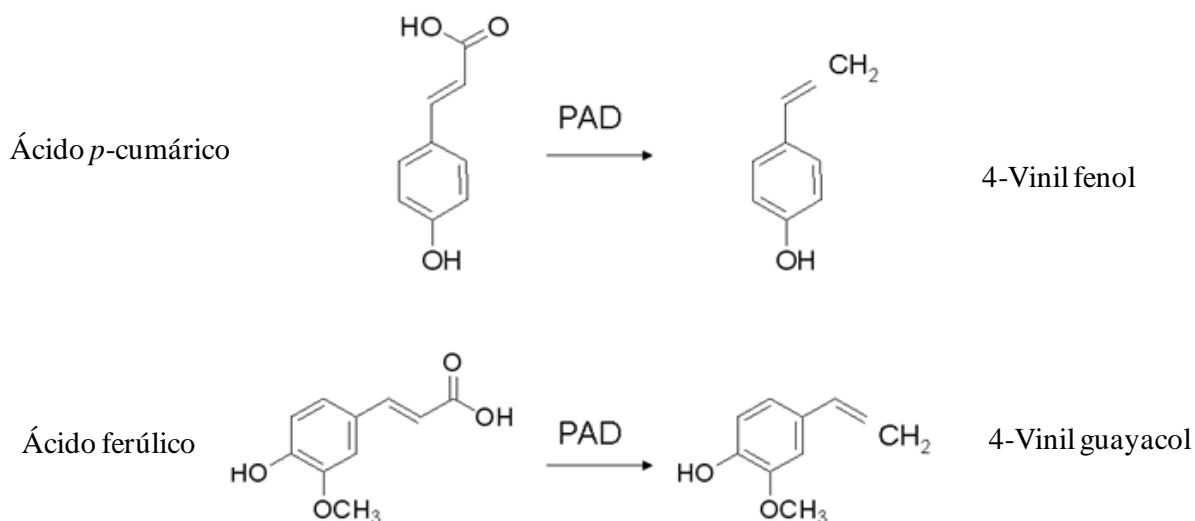
posteriormente descarboxilarlos a etil catecol y etil fenol. Whiting y Coggins (1971) también describieron que en esta especie una reacción de reducción transformaba el quinato en siquimato y dihidrosiquimato.

Alberto *et al.* (2004) describieron que *L. hilgardii* era capaz de degradar el ácido gálico y la catequina en medios de cultivo complejos. Las sustancias detectadas en los sobrenadantes de los cultivos en presencia de ácido gálico fueron pirogalol, catecol, los ácidos protocatéquico y *p*-hidroxibenzoico, alcohol *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído y el propio gálico; mientras que en los cultivos con catequina se detectaron ácido gálico, pirogalol, catecol, ácido *p*-hidroxibenzoico, acetovanillona, ácido homovanílico y la propia catequina. Se ha observado que *O. oeni* puede metabolizar antocianinas y otros fenólicos para producir compuestos aromáticos con importancia en las características finales del vino y que algunos aromas son producidos por la hidrólisis de sustancias precursoras de glicoconjugados mediante la acción de glicosidasas (Vivas *et al.*, 1997; Boido *et al.*, 2002; Ugliano *et al.*, 2003; Revel *et al.*, 2005).

Bloem *et al.* (2007) estudiaron en diversas bacterias lácticas la producción de vanillina (también denominada vanilina o vainilla) a partir de fenoles simples y determinaron que las cepas ensayadas no eran capaces de producir este compuesto cuando se añadían eugenol, isoeugenol o ácido vinílico como sustratos. Sin embargo, *O. oeni* y *Lactobacillus* sp. metabolizaron el ácido ferúlico a vanillina con bajo rendimiento, mientras que las cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* lo transformaron en 4-vinil guayacol. En general todas las cepas de BAL utilizadas redujeron la vanillina a su correspondiente alcohol vanilínico.

La producción de fenoles volátiles se ha investigado en diversas especies de BAL. Se ha descrito que *L. brevis*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus* descarboxilan los ácidos *p*-cumárico y ferúlico para formar 4-vinil fenoles, en tanto que *O. oeni* solo sintetiza cantidades trazas de estas sustancias (Cavin *et al.*, 1993) y de las tres especies estudiadas, sólo *L. plantarum* fue capaz de producir 4-etil fenol (Chatonnet *et al.*, 1995) (Figura 8). Beek y Priest (2000) evaluaron la degradación de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico en siete especies de *Lactobacillus* aisladas durante la fermentación de malta destinada a la elaboración de whisky en las cuales se había demostrado la presencia del gen *pdC* que codifica la descarboxilasa de los ácidos fenólicos. *L. crispatus* H8, *L. pentosus* 128 y *L. plantarum* 72 descarboxilaron los ácidos *p*-cumárico y ferúlico; los resultados para *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. paracasei* no fueron concluyentes y *L. hilgardii* no presentó actividad. Couto *et al.* (2006) también determinaron la capacidad de producir fenoles volátiles a partir de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico en 20 especies de bacterias lácticas. Los resultados indicaron que sólo *L. brevis*, *L.*

*collinoides* y *L. plantarum* redujeron los vinil fenoles a etil fenoles. Las cepas de *P. pentosaceus* sintetizaron 4-vinil fenol y *O. oeni*, *L. hilgardii* y *L. mesenteroides* no metabolizaron el ácido *p*-cumárico.



**Figura 8.** Producción de fenoles volátiles en *L. brevis*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus*.

Estudios posteriores mediante PCR describieron que en *O. oeni*, *L. hilgardii* y *L. mesenteroides* no se detectó la amplificación del fragmento esperado del gen *pdc* que codifica la descarboxilasa del ácido *p*-cumárico, así como tampoco se observó la degradación de los ácidos hidroxicinámicos; por el contrario se corroboró la presencia del gen *pdc* en *L. brevis* y se observó la producción de 4-vinil fenol, 4-vinil-guayacol y 4-vinil catecol en cultivos suplementados con 1 mM de los respectivos ácidos hidroxicinámicos (de las Rivas *et al.*, 2009).

Curiel *et al.* (2010) estudiaron la degradación de 15 ácidos fenólicos, tanto derivados de los ácidos cinámicos como benzoicos, en tres cepas de *L. brevis* que provenían de hábitats diferentes (vino, saliva humana y heces humanas). Contrariamente a lo descrito para otras cepas de *L. brevis* (Cavin *et al.*, 1993 y Couto *et al.*, 2006), los tres aislados fueron incapaces de producir los etil derivados producto de la reducción de los vinil derivados correspondientes a la descarboxilación de los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico (Figura 9). En este estudio también se comprobó la imposibilidad de estas cepas de sintetizar 4-etil fenoles a partir de las

formas reducidas de los ácidos hidroxicinámicos (ácidos florético, hidroferúlico e hidrocafeico, respectivamente). En cuanto a la transformación de los ácidos gálico, protocatéquico, benzoico, salicílico y vanilínico, se observó que las tres cepas de *L. brevis* descarboxilaron los ácidos gálico y protocatéquico de forma equivalente produciendo pirogalol o catecol, respectivamente, mientras que los ácidos restantes no se metabolizaron.

Estudios recientes describen que ciertas cepas de *Lactobacillus* sintetizan casi exclusivamente 4-vinil fenol en presencia de altos niveles de glucosa (20 g/L), mientras que a concentraciones inferiores de 5 g/L se produce principalmente 4-etil fenol; de forma equivalente un incremento en la concentración de ácido málico también da lugar a la formación de 4-vinil fenol (Silva *et al.*, 2011).

### 1.5.1. METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN *L. PLANTARUM*

Una parte importante de las reacciones involucradas en la biotransformación de los compuestos fenólicos por la especie *L. plantarum* aún son desconocidas, así como también los mecanismos de activación o represión por azúcares, otros metabolitos secundarios y ciertas variaciones en las condiciones del medio ambiente donde se desarrolla esta especie. En estudios realizados por Whiting (1975) se describió que *L. plantarum* reducía el ácido quínico a los ácidos carboxílico dihidroxiclohexano y acético a través de una ruta metabólica que incluye 11 reacciones mediadas por enzimas inducibles. Por otra parte, también se describió que en condiciones anaerobias de crecimiento, esta bacteria reducía el quinato y al mismo tiempo oxidaba una porción del sustrato a catecol, en una ruta que incluye la participación de una deshidrogenasa NAD-dependiente y de una descarboxilasa del ácido protocatéquico.

Ciafardini *et al.* (1994) y Marsilio *et al.* (1996) describieron la degradación de la oleuropeína por varias cepas de *L. plantarum*. Inicialmente la actividad de una  $\beta$ -glucosidasa origina una aglicona que posteriormente, por la actividad de una esterasa, se transforma en hidroxitirosol y ácido elenoico. Adicionalmente se ha descrito que la glucosa inhibe la actividad  $\beta$ -glucosidasa (Rozès y Peres, 1996; Marsilio y Lanza, 1998). Sestelo *et al.* (2004) purificaron una proteína de *L. plantarum* que presenta actividad  $\beta$ -glucosidasa frente a sustratos aril  $\beta$ -glucósidos y disacáridos que presentan uniones tipo  $\beta$  (“ $\beta$ -link”). Se ha descrito la existencia de una región en el genoma de esta especie que codifica una posible glucosidasa cuya expresión es regulada por ciertos tipos de estrés abióticos como el pH y la temperatura (Spano *et al.*, 2005).

Cavin *et al.* (1993) realizaron los primeros estudios sobre la biodegradación de los ácidos fenólicos por *L. plantarum*. Posteriormente, se demostró que los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico se transforman por la acción de la enzima descarboxilasa de ácidos fenólicos (PAD) en sus 4-vinil derivados y luego éstos por la actividad de una reductasa, son metabolizados a 4-etil fenol, 4-etil guayacol y 4-etil catecol, respectivamente (Cavin *et al.*, 1997a; Barthelmebs *et al.*, 2000a; Landete *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008) (Figura 9). Cavin *et al.* (1997a) purificaron y caracterizaron la PAD de *L. plantarum* estableciendo que se trataba de una enzima inducible con afinidad por los ácidos *p*-cumárico y cafeico, pero que no exhibía actividad frente al ácido ferúlico, lo que sugería la posible existencia de dos descarboxilasas (Cavin *et al.*, 1997b). Más tarde, Barthelmebs *et al.* (2000a) en sus estudios con una cepa mutante que tenía interrumpido el gen que codifica la PAD (*pdC*) describieron que el ácido *p*-cumárico se metabolizaba por la acción de una segunda descarboxilasa que se inducía mejor frente al ácido ferúlico que al *p*-cumárico, lo que confirmaba la existencia de otra descarboxilasa de los ácidos fenólicos. Sin embargo hasta hoy día, la segunda descarboxilasa de los ácidos fenólicos permanece sin identificar.

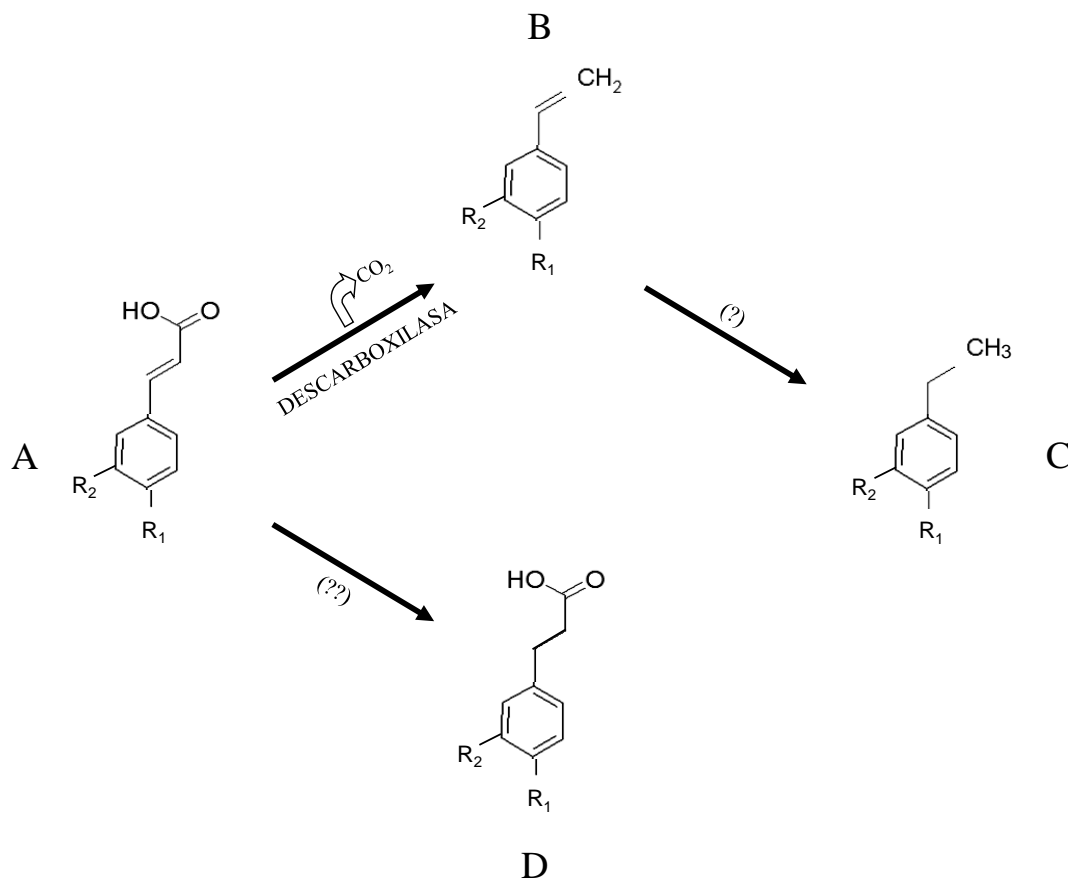
Los estudios realizados en una cepa mutante que carece de la actividad PAD indicaron que tenía una velocidad de crecimiento menor que la cepa silvestre o “wild type” (WT), en presencia de los tres ácidos hidroxicinámicos; lo que llevó a considerar que la síntesis de éstas enzimas representaba una respuesta específica frente al estrés químico derivado de la toxicidad de éstos ácidos fenólicos (Gury *et al.*, 2004).

Una última actividad descrita en *L. plantarum* que está relacionada con el metabolismo de los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico es la biotransformación de éstos mediante una reductasa que da lugar a los ácidos propiónicos hidroxifenil e hidroximetoxifenil derivados (HPPA) (Barthelmebs *et al.*, 2000a; Rodríguez *et al.*, 2008a) (Figura 9).

En cuanto a la degradación de polifenoles, ciertas cepas de *L. plantarum* aisladas de vinos y otros alimentos fermentados, así como también de muestras colorrectales de algunos mamíferos, presentan la capacidad de degradar taninos mediante una enzima con actividad tanasa (Osawa *et al.*, 2000; Nishitani y Osawa, 2003; Nishitani, *et al.*, 2003; Vaquero *et al.*, 2004). Ayed y Hamdi (2002) determinaron las condiciones óptimas de concentración de glucosa y pH en las cuales la enzima tanasa de *L. plantarum* es activa. Posteriormente, Iwamoto *et al.* (2008) identificaron el gen *tanLpI* que codifica esta enzima, la definieron como una enzima tanin acil hidrolasa (TanLpI), la clonaron en *E. coli* y la purificaron y caracterizaron. Rodríguez *et al.* (2008d) estudiaron la capacidad de *L. plantarum* CECT 748<sup>T</sup>



para degradar taninos hidrolizables utilizando para ello tres ácidos tánicos comerciales y concluyeron que la biotransformación ocurre vía una despolimerización de los taninos de alto peso molecular y una reducción de los de bajo peso. Cultivos de esta cepa fueron incapaces de degradar ácido tánico, sin embargo los estudios utilizando extractos libres de células si presentaron actividad frente a los taninos (Rodríguez *et al.*, 2008d). Como resultado de la degradación de los taninos, se ha descrito la formación de ácido gálico y pirogalol.

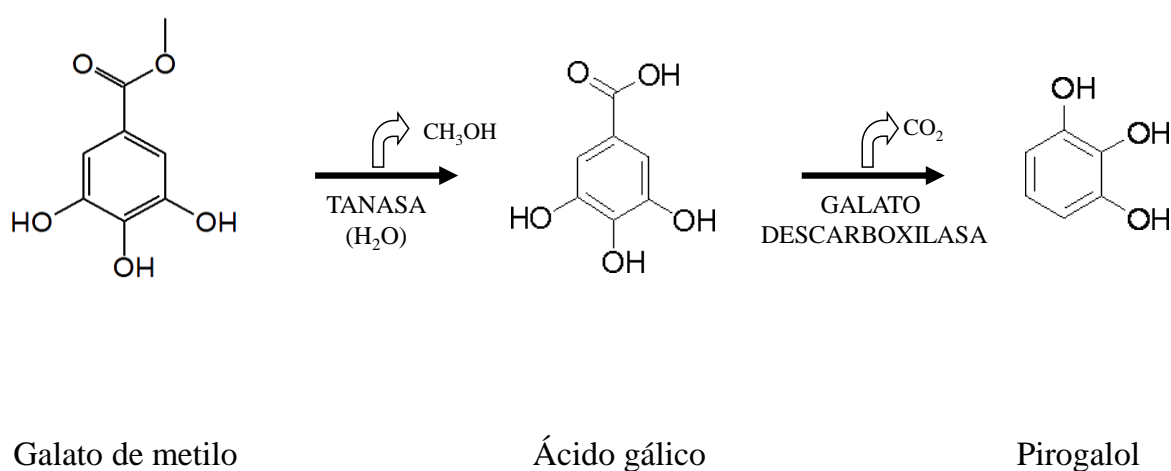


**Figura 9.** Posibles rutas metabólicas que participan en la degradación de los ácidos hidroxicinámicos. Cuando R<sub>1</sub> (OH) y R<sub>2</sub> (H) los compuestos representados son el ácido *p*-cumárico (A), 4-vinil fenol (B), 4-etil fenol (C) y ácido florético (D). Cuando R<sub>1</sub> (OH) y R<sub>2</sub> (OH) los compuestos representados son el ácido cafeico (A), 4-vinil catecol (B), 4-etil catecol (C) y ácido hidrocafeico (D). Cuando R<sub>1</sub> (OH) y R<sub>2</sub> (OCH<sub>3</sub>) los compuestos representados son el ácido ferúlico (A), 4-vinil guayacol (B), 4-etil guayacol (C) y ácido hidroferúlico (D).

Landete *et al.* (2007) describieron la degradación del ácido gálico por *L. plantarum* como una reacción de descarboxilación no oxidativa que da origen a pirogalol. Esta especie también presenta la capacidad de degradar el ácido protocatéquico a catecol y el galato de

metilo a ácido gálico y pirogalol (Figura 10); sin embargo otros compuestos derivados del ácido benzoico como los ácidos *p*-hidroxibenzoico, gentísico, salicílico, verátrico, vanilínico y siríngico no son metabolizados por cepas de esta especie (Landete *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.* 2008a). Recientemente se ha descrito la caracterización de la enzima responsable de la descarboxilación del ácido gálico en *L. plantarum* (Curiel, 2010; Jiménez *et al.*, 2013).

En la tabla III se presenta un resumen de los resultados de las investigaciones realizadas sobre el metabolismo de los compuestos fenólicos en *L. plantarum*. Las investigaciones demuestran que esta especie posee diversas habilidades metabólicas para degradar un número limitado (hasta el conocimiento actual) pero importante de compuestos fenólicos. Hasta el presente, tan solo se han caracterizado genética y bioquímicamente la enzima tanasa (TanLp1), la descarboxilasa del ácido *p*-cumárico (PAD) y la galato descarboxilasa.



**Figura 10.** Biotransformación del galato de metilo por la enzima tanasa.

**Tabla III.** Metabolismo de compuestos fenólicos por *Lactobacillus plantarum*.

| Sustrato                        | Productos   | Enzimas implicadas               | Referencia  |
|---------------------------------|---|----------------------------------|---|
| Acido gálico                    | Pirogalol   | Galato descarboxilasa            | Landete <i>et al.</i> , 2007;<br>Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a;<br>Jiménez <i>et al.</i> , 2013.                                    |
| Acido protocatéquico            | Catecol   | Galato descarboxilasa            | Jiménez <i>et al.</i> , 2013;<br>Landete <i>et al.</i> , 2008;<br>Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.                                    |
| Acido benzoico                  | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido <i>p</i> -hidroxibenzoico | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Pirogalol                       | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Galato de metilo                | Acido gálico<br>Pirogalol   | Tanasa<br>Galato descarboxilasa  | Landete <i>et al.</i> , 2007;<br>Rodríguez <i>et al.</i> , 2008.<br>Rodríguez <i>et al.</i> , 2008.                                   |
| Acido salicílico                | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido siríntrico                | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido verátrico                 | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido vanilínico                | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido cafeico                   | 4-vinil catecol<br>4-etil catecol                                       | PAD <sup>a</sup><br>Reductasa    | Cavin <i>et al.</i> , 1997a;<br>Cavin <i>et al.</i> , 1997b;<br>Barthelmebs <i>et al.</i> , 2000;<br>Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a. |
|                                 | Acido hidrocafeico  | Reductasa                        |   |
| Acido ferúlico                  | 4-vinil guayacol<br>4-etil guayacol                                     | PAD <sup>a</sup><br>Reductasa    | Cavin <i>et al.</i> , 1997a;<br>Cavin <i>et al.</i> , 1997b;<br>Landete <i>et al.</i> , 2007.   |
|                                 | Acido hidroferúlico   | Reductasa                        | de las Rivas <i>et al.</i> , 2009.  |
| Acido <i>m</i> -cumárico        | Acido 3-(3-hidroxifenil<br>propiónico                                   | Reductasa                        | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido <i>o</i> -cumárico        | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido <i>p</i> -cumárico        | 4-vinil fenol<br>4-etil fenol   | PAD <sup>a</sup><br>Reductasa    | Cavin <i>et al.</i> , 1997a;<br>Cavin <i>et al.</i> , 1997b;<br>Landete <i>et al.</i> , 2007;<br>Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.     |
|                                 | Acido florético   | Reductasa                        | Barthelmebs <i>et al.</i> , 2000.   |
| Acido clorogénico               | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido sinapínico                | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido florético                 | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido elágico                   | No degradado  |                                  | Rodríguez <i>et al.</i> , 2008a.  |
| Acido tánico                    | Acido gálico<br>Pirogalol   | Tanasa<br>Galato descarboxilasa  | Osawa <i>et al.</i> , 2000;<br>Rodríguez <i>et al.</i> , 2008d.   |
| Oleuropeína                     | Oleuropeína aglicona<br>y glucosa<br>Hidroxitirosol y ácido<br>elenoico | $\beta$ -Glucosidasa<br>Esterasa | Ciafardini <i>et al.</i> , 1994;<br>Marsilio <i>et al.</i> , 1996.<br>Marsilio y Lanza, 1998.   |
| Acido quínico                   | Catecol   |                                  | Whiting y Coggins, 1971;<br>Whiting 1975.   |
| Acido siquímico                 | Catecol   |                                  | Whiting y Coggins, 1971;<br>Whiting 1975.   |

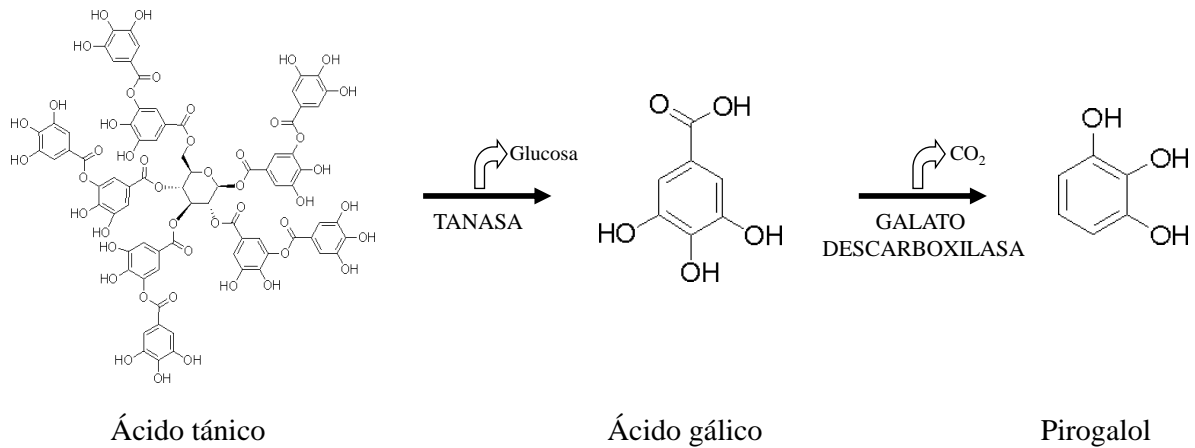
<sup>a</sup>Descarboxilasa de los ácidos fenólicos (PAD)

### 1.5.1.1. DEGRADACIÓN DE TANINOS Y ÁCIDO GÁLICO: ENZIMAS Y GENES INVOLUCRADOS

Numerosas especies de hongos y bacterias son capaces de contrarrestar los efectos tóxicos de los taninos a través de su degradación y llegando en muchos casos a utilizarlos como fuente de carbono y energía. Estudios realizados por Lewis y Starkey (1969) describen la degradación de taninos por hongos como *Aspergillus niger* o *Penicillium* sp. o por bacterias como *Achromobacter*. Posteriormente se han ido reuniendo datos que permiten establecer que la biotransformación de los galotaninos procede a través de una ruta común mediada por la enzima tanasa (EC.3.1.1.20) siendo esta una esterasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces ésteres presentes en ésteres del ácido gálico como el galato de metilo o el ácido tánico, para producir ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997); el cual posteriormente se descarboxila formando pirogalol por la acción de una enzima galato descarboxilasa (EC.4.1.1.59) (Figura 11). Si la degradación procede vía aeróbica, una dioxigenasa ocasiona la apertura del anillo aromático lo que lleva finalmente a la formación de ácido propiónico y pirúvico que se incorpora al ciclo de Krebs (Kumar *et al.*, 1999). En los casos en los que la transformación continúa en condiciones de anaerobiosis, el pirogalol se puede degradar mediante la ruta del fluoroglucinol o la del resorcinol (Brune *et al.*, 1992). La formación del pirogalol es la etapa final en el caso de aquellas especies que no poseen la capacidad de abrir el anillo aromático (Odenyo *et al.*, 2001; Chamkha *et al.*, 2002). La enzima tanasa se ha descrito en plantas (frutos, hojas, corteza), animales (en el intestino o mucus de rumiantes) y microorganismos, siendo éstos últimos los productores por excelencia de esta proteína (Lekha y Lonsane, 1997; Nierenstein, 1930; Bhat *et al.*, 1998).

La mayoría de los estudios relacionados con la producción de tanasas se han realizado en hongos siendo las especies *A. niger*, *A. oryzae* y *A. awamori* las principales productoras de estas enzimas (Saxena *et al.*, 1995). Barthomeuf *et al.* (1994) purificaron y caracterizaron la enzima tanasa de *A. niger* indicando que se trata de una glicoproteína que contiene cerca de un 43% de azúcar. Noguchi *et al.* (2007) identificaron el gen que codifica la enzima tanasa de *Staphylococcus lugdunensis* y a partir de éste se localizó en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 el gen *lp\_2956* que codifica una proteína (TanLp1) de 469 aminoácidos con un 28,8% de identidad respecto a la tanasa de *S. lugdunensis* (Iwamoto *et al.*, 2008). Se conoce poco sobre la regulación genética de la síntesis de las enzimas tanasas y la mayoría de los datos de los que se dispone corresponden a estudios un tanto contradictorios realizados en hongos, que describen desde una expresión constitutiva (Siegenthaler *et al.*, 1997) hasta una

inducción controlada por sustrato o represión por catabolito (Bajpai y Patil, 1997; Banerjee *et al.*, 2001).

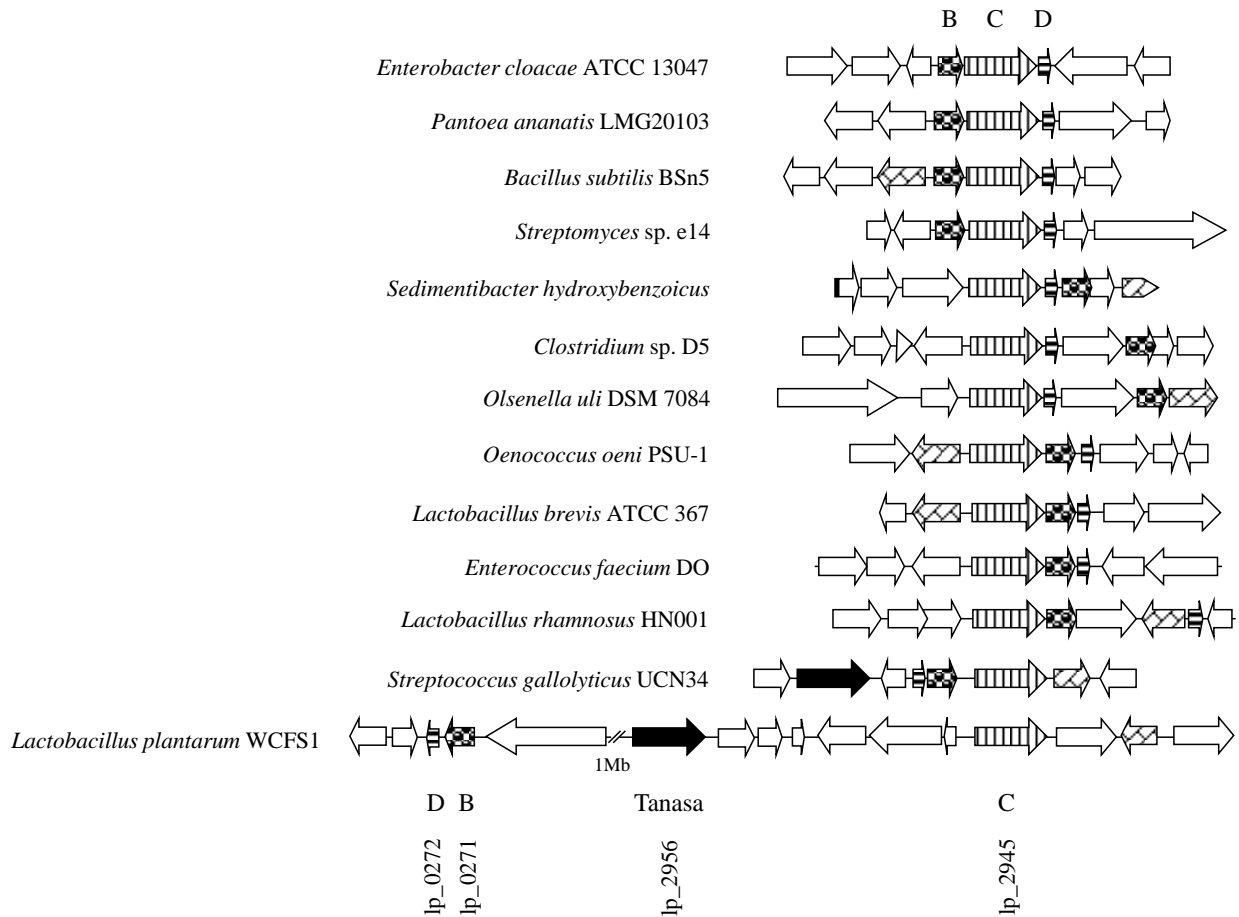


**Figura 11.** Metabolismo del ácido tánico y del ácido gálico en *L. plantarum*.

Los genes involucrados en la actividad galato descarboxilasa en la especie *L. plantarum* se identificaron recientemente como *lpdB* (*lp\_0271*), *lpdC* (*lp\_2945*) y *lpdD* (*lp\_0272*) (Jiménez *et al.*, 2013). Se han identificado y secuenciado los genes que codifican otras enzimas descarboxilasas no oxidativas de ácidos aromáticos como la 4-hidroxibenzoato descarboxilasa de *Bacillus subtilis* o la enzima vainillato descarboxilasa de *Streptomyces* sp. D7. Estos genes se presentan agrupados en operones, presentando similitud con otros genes bacterianos que codifican proteínas anotadas como posibles descarboxilasas del ácido 3-octaprenil-4-hidroxibenzoico, similares a las enzimas UbiD o UbiX de *E. coli* (Zhang y Javor, 2003; Lupa *et al.*, 2005). *L. plantarum* es la única bacteria donde el gen *lpdC* está separado en el cromosoma de los genes *lpdB* y *lpdD* (Figura 13).

A partir de extractos de células de *E. coli* que expresan cada uno de los tres genes por separado, se demostró que solo se requiere LpdC para producir la actividad galato desacarboxilasa; sin embargo, la interrupción de estos genes en *L. plantarum* indicó que los productos de los genes *lpdB* y *lpdC* son esenciales para la degradación del ácido gálico a pirogalol. Se ha descrito que la proteína LpdC (Lp\_2945) actúa sobre el ácido gálico y el ácido protocatéquico (Jiménez *et al.*, 2013) y estudios preliminares indican que la regulación

genética de los genes que codifican la actividad galato descarboxilasa es inducible por sustrato y que el ácido gálico y protocatéquico incrementan el nivel de expresión de los genes *lpdB* y *lpdC* (Curiel, 2010).

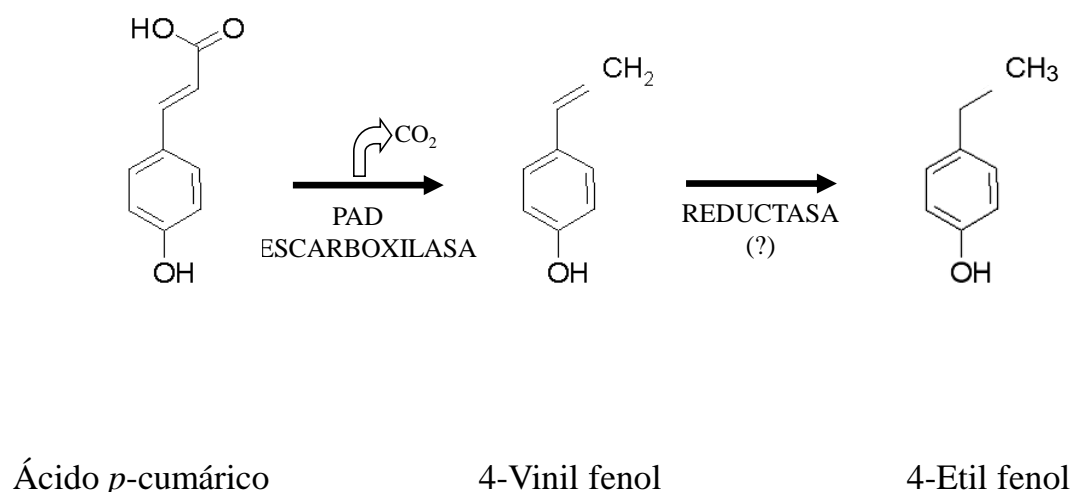


**Figura 13.** Organización genética de los genes involucrados en la actividad galato descarboxilasa en *L. plantarum* WCFS1 y su comparación con otras especies.

#### 1.5.1.2. DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO *P*-CUMÁRICO Y OTROS ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS: ENZIMAS Y GENES INVOLUCRADOS

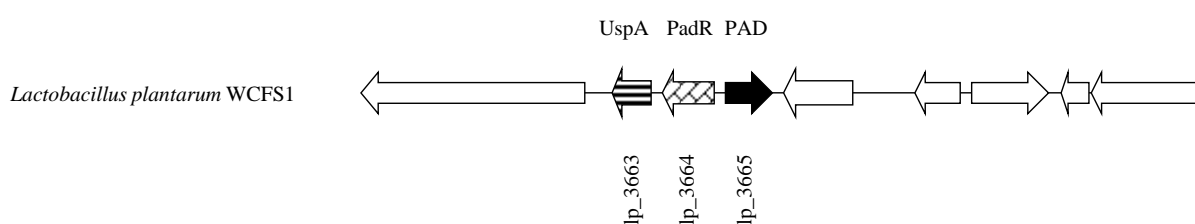
Los resultados de diversos estudios indican que los ácidos fenólicos pueden ser transformados a fenoles volátiles a través de dos rutas metabólicas: i) la descarboxilación para formar los 4-vinil fenol derivados seguida de la reducción de éstos para formar los 4-etil fenol derivados (Figura 14), y ii) pueden ser primero reducidos a sus ácidos propiónicos fenil sustituidos para luego descarboxilarse en sus 4-etil derivados, aunque ésta última vía no se

ha demostrado bioquímicamente (Barthelmebs *et al.*, 2000a; Curiel *et al.*, 2010). *L. plantarum* presenta una enzima descarboxilasa del ácido *p*-cumárico (PAD) que es inducible por sustrato y está codificada por el gen *pdc*. Estudios realizados con la cepa LPCHL2 indicaron que la proteína PAD producida en forma recombinante en células de *E. coli* posee 174 aminoácidos y una alta especificidad por los ácidos *p*-cumárico y cafeico, aunque no por el ácido ferúlico (Cavin *et al.*, 1997b). Posteriormente, Rodríguez *et al.* (2008b) sobreexpresaron, purificaron y caracterizaron la PAD de *L. plantarum* 748<sup>T</sup> y evaluaron su afinidad y actividad frente a estos tres ácidos hidroxicinánicos. Los resultados indican que los tres ácidos se descarboxilan a sus correspondientes 4-vinil derivados aunque la velocidad de degradación y afinidad por los dos primeros ácidos fue superior. Estas diferencias se atribuyen a las diferencias entre ambas proteínas en su tamaño (178 residuos frente a 174) y en la secuencia de aminoácidos de su extremo C-terminal. Por su parte, el gen *pdc* que codifica la enzima PAD en las cepas 748<sup>T</sup> (ATCC 14917) y WCFS1 (NCIMB8826; ATCC BAA-793) presenta una elevada similitud. Estudios de cristalización han permitido establecer que la PAD es una enzima homodimérica, carente de cofactores, en la que cada subunidad de 178 residuos tiene un dominio único y su plegamiento está basado en dos láminas  $\beta$  formando un  $\beta$ -“sandwich” central que adopta topología de barril para generar una cavidad anfipática tapizada internamente tanto por residuos hidrofóbicos (aromáticos) como polares que es el sitio de unión para el sustrato (Rodríguez *et al.*, 2010).



**Figura 14.** Metabolismo del ácido *p*-cumárico en *L. plantarum*.

La expresión del gen *pdc* se induce en presencia de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico (Cavin *et al.*, 1997a). En *P. pentosaceus* se describió la existencia del gen *padR*, organizado en un operon bicistrónico que se autoregula, que es el represor transcripcional del gen *padA* (descarboxilasa de los ácidos fenólicos) en esta especie (Barthelmebs *et al.*, 2000b). En *L. plantarum* existe una organización genética idéntica, donde el gen *padR* codifica una proteína PadR que reprime la transcripción del gen *pdc* y se localiza adyacente pero en dirección divergente a éste (Figura 15). En relación a esta represión, se ha descrito que la delección del gen *padR* ocasiona la sobreexpresión constitutiva del gen *pdc* (Gury *et al.*, 2004).



**Figura 15.** Organización genética de los genes involucrados en la actividad PAD descarboxilasa en *L. plantarum* WCFS1.

El conocimiento del metabolismo de los compuestos fenólicos en *L. plantarum* y los mecanismos que lo regulan es de gran interés para la investigación en tecnología de alimentos ya que la disponibilidad de estas enzimas podría facilitar su uso como aditivos estabilizantes o como catalizadores en la obtención de sustancias aromatizantes, antioxidantes o de alto valor añadido.

Se ha sugerido que las reacciones de transformación en las que participan las enzimas galato descarboxilasa y la PAD descarboxilasa representan una respuesta específica frente al estrés derivado de la presencia de algunos ácidos fenólicos. Sin embargo, el grado de toxicidad de los ácidos gálico y protocatéquico, parece ser menor que el de ácidos como el *p*-cumárico, ferúlico y tánico y podrían ser un reflejo de las diferencias en su naturaleza química y estructural que se derivan del número y tipo de sustituciones en los carbonos que forman parte del anillo fenólico central, así como también de su asociación con otras moléculas.

La realización de estudios transcriptómicos a escala global permite ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de adaptación y tolerancia que utiliza la especie *L. plantarum* en presencia de los compuestos fenólicos y que podrían representar una ventaja competitiva frente al resto de la microbiota que cohabita en los ambientes donde ella se desarrolla.



## **II. OBJETIVOS**



Los compuestos fenólicos son importantes metabolitos secundarios de las plantas que poseen propiedades antioxidantes y previenen los fenómenos de oxidación asociados a la presencia de radicales libres o sustancias oxidantes, sin embargo pueden desempeñar un doble papel en donde a bajas concentraciones presentan efectos positivos, mientras que en cantidades elevadas podrían desencadenar efectos negativos de estrés general por su acción pro-oxidante, así como también, estar relacionados con procesos antinutricionales por la precipitación de proteínas y otras sustancias. Los ácidos fenólicos representan cerca de un tercio del total de los compuestos fenólicos presentes en las plantas y numerosos estudios han evaluado su influencia en el crecimiento de diversas especies de microorganismos determinado diferencias importantes. Por otro lado, las bacterias lácticas forman parte de la microbiota autóctona de los alimentos de origen vegetal y se ha descrito que algunas especies de *Lactobacillus* poseen rutas metabólicas que les permiten adaptarse a la presencia de los compuestos fenólicos. En la actualidad se dispone de escasa información en la especie modelo *L. plantarum* y aunque se han descrito dos actividades descarboxilasas, una que actúa sobre los ácidos hidroxibenzoicos y otra sobre los ácidos hidroxicinámicos, se desconocen las redes de regulación y los mecanismos de respuesta que a escala global despliega esta bacteria para resistir y sobrevivir a la presencia de estos ácidos fenólicos, en los diferentes ambientes donde se desarrolla incluido el TGI. Por ello, este estudio pretende evaluar mediante micromatrices de ADNc la respuesta transcriptómica de *L. plantarum* WCFS1 frente al ácido gálico, como representante de los ácidos hidroxibenzoicos, que adicionalmente forma parte constituyente de otros compuestos como los taninos y se ha descrito que no afecta el crecimiento de algunas especies de lactobacilos; y el ácido *p*-cumárico, como representante de los ácidos hidroxicinámicos, que normalmente se presenta formando complejos y se ha descrito entre los compuestos fenólicos con mayor acción antibacteriana. Teniendo en cuenta estos antecedentes en esta memoria se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto que los ácidos gálico y *p*-cumárico ejercen sobre el crecimiento de *L. plantarum* WCFS1 y determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de cada compuesto en las mismas condiciones de cultivo empleadas para la extracción del ARN que será destinado al análisis mediante micromatrices de ADNc.
2. Investigar la expresión génica global de *L. plantarum* WCFS1 en respuesta a la presencia de los ácidos gálico y *p*-cumárico mediante análisis de micromatrices de ADNc y validar los resultados por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

3. Interpretar la respuesta transcriptómica de *L. plantarum* WCFS1 en presencia de los ácidos gálico y *p*-cumárico para establecer los posibles mecanismos de tolerancia y adaptación que esta bacteria utiliza frente a compuestos fenólicos que de forma natural se encuentran en sustratos vegetales y son comunes en la dieta humana.
4. Determinar el efecto que produce la presencia de los ácidos gálico o *p*-cumárico en el crecimiento de cepas de *L. plantarum* WCFS1 que carecen de la actividad galato descarboxilasa y PAD descarboxilasa respectivamente.
5. Analizar mediante RT-qPCR los cambios en el patrón de regulación transcripcional de los principales genes implicados en la respuesta a ambos ácidos fenólicos en cepas mutantes que carece de la actividad descarboxilasa correspondiente.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

La expresión génica global en presencia de los compuestos fenólicos se ha estudiado en la cepa *Lactobacillus plantarum* WCFS1, cedida por el Dr. Michiel Kleerebezem (NIZO Food Research, Holanda). Esta cepa proviene de una única colonia aislada de un cultivo de *L. plantarum* NCIMB 8826 (Hayward 3A o ATCC BAA-793) que previamente fue aislado de saliva humana. Las cepas DH5 $\alpha$  y DH10B de *Escherichia coli* se utilizaron para la preparación de células competentes y su posterior transformación con los plásmidos derivados de pUCE191. Las cepas bacterianas, los mutantes derivados de *L. plantarum* WCFS1 y los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la tabla IV.

**Tabla IV.** Bacterias y plásmidos utilizados en este estudio.

| Bacteria o plásmido             | Genotipo/Fenotipo relevante <sup>a</sup>  | Referencia/Origen                |
|---------------------------------|---|----------------------------------|
| <b>Bacteria</b>                 |   |                                  |
| <i>Escherichia coli</i>         |   |                                  |
| DH5 $\alpha$                    | F <sup>-</sup> $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacIZYA-argF) recA1 gyrA endA1 relA1 supE44 hsdR17   | Clontech<br>Hanahan, 1983        |
| DH10B                           | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 endA1 recA1 deoR $\Delta$ (ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL $\lambda$ <sup>-</sup> |                                  |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>  |   |                                  |
| WCFS1 (NCIMB <sup>b</sup> 8826) | Cepa “wild type”  | Dr. Kleerebezem                  |
| WCFS1 $\Delta$ lp_1424          | derivada de WCFS1; $\Delta$ lp_1424   | Este estudio                     |
| WCFS1 $\Delta$ lp_1425          | derivada de WCFS1; $\Delta$ lp_1425   | Este estudio                     |
| WCFS1 $\Delta$ lp_1426          | derivada de WCFS1; $\Delta$ lp_1426   | Este estudio                     |
| WCFS1 $\Delta$ lpdC (lp_2945)   | derivada de WCFS1; $\Delta$ lpdC  | Jiménez <i>et al.</i> , 2013     |
| WCFS1 $\Delta$ lp_2942          | derivada de WCFS1; $\Delta$ lp_2942   | Jiménez <i>et al.</i> , 2013     |
| WCFS1 $\Delta$ pad (lp_3665)    | derivada de WCFS1; $\Delta$ pad   | Este estudio                     |
| <b>Plásmidos</b>                |   |                                  |
| pUCE191                         | Vector integrado en <i>L. plantarum</i> , derivado de pUC19, Amp <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>   | Arrecubieta <i>et al.</i> , 1995 |
| pUCE191-lp1424                  | pUCE191 con un fragmento interno de lp_1424   | Este estudio                     |
| pUCE191-lp1425                  | pUCE191 con un fragmento interno de lp_1425   | Este estudio                     |
| pUCE191-lp1426                  | pUCE191 con un fragmento interno de lp_1426   | Este estudio                     |
| pUCE191-lpdC                    | pUCE191 con un fragmento interno de lp_2945   | Curiel, 2010                     |
| pUCE191-lpdB                    | pUCE191 con un fragmento interno de lp_0271   | Jiménez <i>et al.</i> , 2013     |
| pUCE191-lpdD                    | pUCE191 con un fragmento interno de lp_0272   | Jiménez <i>et al.</i> , 2013     |
| pUCE191-pad                     | pUCE191 con un fragmento interno de lp_3665   | Este estudio                     |

<sup>a</sup> Amp<sup>r</sup>, ampicilina resistente; Em<sup>r</sup>, eritromicina resistente.

<sup>b</sup> NCIMB, National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria, Scotland, UK (<http://www.ncimb.co.uk>)

Los oligonucleótidos sintetizados por Eurofins MWG / Operon Synthesis GmbH (Tabla V), se reconstituyeron con tampón TE y diluyeron a una concentración de 1-5  $\mu$ M en agua de biología molecular (Sigma).

## 3.2. MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y ESTUDIOS DEL CRECIMIENTO

Las cepas se conservaron congeladas a -80 °C en medio de cultivo al que se le añadió en proporción 1:3 una solución estéril de glicerol al 50%. En el momento de su uso, se descongelaron y se cultivaron en los medios correspondientes.

Tanto para extraer el ADN o el ARN de *L. plantarum*, las cepas se descongelaron y cultivaron en medio MRS (Pronadisa, España) a 30 °C y sin agitación. A este medio se le incorporó agar al 1,5% cuando se requirió trabajar en medio sólido. Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37 °C en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), añadiendo agar en las condiciones descritas en el párrafo anterior para el cultivo en sólido. La concentración final de los antibióticos empleados para el cultivo de las cepas de *E. coli* resistentes fue de 100 µg/ml de ampicilina. En el caso de *L. plantarum* se emplearon 10 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de lincomicina.

La degradación de los compuestos fenólicos se estudió cultivando las bacterias en el medio basal RPM derivado del descrito por Rozès y Peres (1998) y adicionado con el compuesto a estudiar a una concentración de 1,5 mM. La composición del medio Rozès y Peres es: 0,5 g/L de citrato dihidratado tri-sodio, 5 g/L de ácido málico, 1 g/L de casaminoácidos, 6,7 g/L de base nitrógeno de levadura sin aminoácidos, y 2g/L de glucosa; pH 5,5. Este medio fue modificado reemplazando la glucosa por galactosa (medio RPM) con la finalidad de evitar una posible represión por catabolito (Landete *et al.*, 2008). La galactosa se esterilizó por filtración a través de 0,20 µm y se añadió posteriormente al resto del medio ya esterilizado. La incubación se realizó a 30 °C sin agitación durante 10 días.

### 3.2.1. EFECTO DE LOS ÁCIDOS GÁLICO Y *p*-CUMÁRICO EN EL CRECIMIENTO DE *L. PLANTARUM*. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

El efecto de los ácidos gálico y *p*-cumárico en el crecimiento de *L. plantarum* WCFS1 se evaluó determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) en medio de cultivo líquido MRS al que se le añade el compuesto fenólico a concentraciones crecientes y empleando como control positivo un cultivo sin adición del compuesto en un volumen total de 10 ml. Las concentraciones finales ensayadas fueron 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 mM para el ácido gálico y 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 y 40 mM para el caso del ácido *p*-cumárico.



**Tabla V.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

| Nombre     | Secuencia (5'→3') <sup>a</sup>   | Fragmento amplificado/Estrategia de clonaje   |
|------------|--|---|
| 274        | CATCATGGTGACGATGACGATAAGATGACA<br>AAAACCTTTTAAA  | Amplificación con 1224 de un fragmento de ADN de 402-pb para corroborar la inserción correcta de pUCE191-pad en el cromosoma de <i>L. plantarum</i> WCFS1                                     |
| 275        | AAGCTTAGTTAGCTATTATGCGTATTACTTA<br>TTTAAACGATGGTAGTTT  | Amplifica con 274 el gen completo <i>lp_3665</i> de 537-pb cuando no es efectiva la interrupción del gen  |
| 387        | CATCATGGTGACGAGACGATAAGATGGCAGAACAA<br>CCATGG  | Amplifica con 387 el gen completo <i>lp_2945</i> de 1500-pb cuando no es efectiva la interrupción del gen   |
| 388        | AAGCTTAGTTAGCTATTATGCGTATTACTTCAAATA<br>CTTCTCCCAGTCA  | Amplificación con 1224 de un fragmento de ADN de 1086-pb para corroborar la inserción correcta de pUCE191-lpdC en el cromosoma de <i>L. plantarum</i> WCFS1                                   |
| 469<br>470 | GTGGTACCACCAACGAATACGCCCAAG<br>TATCTAGAACGCGCAATCGCCTTTTCATC   | Amplifican un fragmento interno de 380-pb del gen <i>lp_2945</i> que fue digerido con KpnI/XbaI y clonado en el plásmido pUCE191 previamente digerido con KpnI/XbaI para generar pUCE191-lpdC |
| 556<br>557 | TGGGTACCTGATCAAAAAGCTGACATCGTCATG<br>TCTCTAGACTGTTCCATTAATCGATGTG  | Amplifican un fragmento interno de 218-pb del gen <i>lp_3665</i> que fue digerido con KpnI/XbaI y clonado en el plásmido pUCE191 previamente digerido con KpnI/XbaI para generar pUCE191-pad  |
| 585<br>586 | AATACGAGTGGTACGCCAAGAAC<br>CCATCCCACCGTGGATTC  | Amplifican un fragmento de 60-pb del gen <i>lp_3665</i> por qPCR  |
| 591<br>592 | GGAGCGTCCGGTACGATTT<br>TGGCCGCTGATGTAACTTTTT   | Amplifican un fragmento de 57-pb del gen <i>lp_0271</i> por qPCR  |
| 593<br>594 | CAACGGCGCCAATTCTG<br>GCCGGTCCTGGCAAATAA  | Amplifican un fragmento de 55-pb del gen <i>lp_2956</i> por qPCR  |
| 597<br>598 | GGTAATCGGCCACATTGG<br>CTGCTGCCTCCCGTAGGA   | Amplifican un fragmento de 57-pb del gen ARNr 16S usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>   |
| 628<br>629 | GGACAGGACGCAGCAAAGA<br>GATGCCCAAACGCGATTT  | Amplifican un fragmento de 57-pb del gen <i>lp_2943</i> por qPCR  |
| 634<br>635 | GGTGGGACCAATCCCCATA<br>GGAACCGTGCTGGCAGTT  | Amplifican un fragmento de 56-pb del gen <i>lp_0272</i> por qPCR  |
| 697<br>698 | CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAAC<br>GAGAAAAATATAAACACA<br>ATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACTTATT<br>AAATAATTTATAGCTATT | Amplifican un fragmento de 803-pb del gen que confiere resistencia a eritromicina de pUCE191  |
| 910<br>911 | CTGGTGCTGCTAAGGCTCTTG<br>TGTGCATGGCCTTGTAATTTACC   | Amplifican un fragmento de 67-pb del gen <i>gapB</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |

| Nombre | Secuencia (5'→3') <sup>a</sup> | Fragmento amplificado/Estrategia de clonaje   |
|--------|--------------------------------|---|
| 912    | TCCGGAAGCAGTCGTCAAG            | Amplifican un fragmento de 53-pb del gen <i>dnaG</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |
| 913    | TCGCCGGCAAGTCAATGT             |   |
| 914    | CCCGACAGCAACGTCTTCA            | Amplifican un fragmento de 60-pb del gen <i>gyrA</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |
| 915    | GGCAGCTGGCGTTTGT               |   |
| 916    | CGGATCCGCCAAATCG               | Amplifican un fragmento de 53-pb del gen <i>rpoD</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |
| 917    | CGTGATGGGTGGCGTAACTT           |   |
| 918    | AACCGCGACAATGTTTTGATT          | Amplifican un fragmento de 62-pb del gen <i>ldhD</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |
| 919    | TTGTGAACGGCAGTTTCAGTGT         |   |
| 920    | CCCGGGTCGCTGCTAAG              | Amplifican un fragmento de 57-pb del gen <i>gyrB</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |
| 921    | TTTCCAAGCCACTCTTTTTTCG         |   |
| 922    | CGGCGGGCAGAACAGAT              | Amplifican un fragmento de 57-pb del gen <i>recA</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |
| 923    | GATCCGGACACGGTTACCAA           |   |
| 924    | GGGTGTGCCTTCTCGTATGAA          | Amplifican un fragmento de 59-pb del gen <i>rpoB</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>  |
| 925    | CAGCCATCCCCAAATGCA             |   |
| 926    | CGCCGAAGAAATGCCAAA             | Amplifican un fragmento de 60-pb del gen <i>ddl</i> usado en los ensayos de qPCR <sup>b</sup>   |
| 927    | GTCAGGTTCTTGATGGGAGCTAA        |   |
| 934    | TCAGTGGCGAAAACTTGAAAA          | Amplifica un fragmento de 61-pb del gen <i>lp_3664</i> por qPCR fuera del área de interrupción  |
| 935    | AACAGCTGCCGACCAGTTG            |   |
| 936    | GCAGAACAACGAGGCGTTAAT          | Amplifica un fragmento de 59-pb del gen <i>lp_3663</i> por qPCR fuera del área de interrupción  |
| 937    | TCCACATCACCGCCTTCAT            |   |
| 938    | GAAGGTGCCGATGCCAATA            | Amplifican un fragmento de 59-pb del gen <i>lp_1261</i> por qPCR  |
| 939    | TTTTCAGCAGCGACCATGTC           |   |
| 940    | GGCATGGTCGGCAGTATCAT           | Amplifican un fragmento de 58-pb del gen <i>lp_0349</i> por qPCR  |
| 941    | TTGTGCGATTAACGGCTTTG           |   |
| 942    | TGAGCGTCATACTGGCACCTT          | Amplifican un fragmento de 56-pb del gen <i>lp_0129</i> por qPCR  |
| 943    | TCGCCGCAACGTTTGG               |   |
| 944    | TCGCAGGTATGGTCGCAAT            | Amplifican un fragmento de 58-pb del gen <i>lp_2799</i> por qPCR  |
| 945    | AACAGAATCCCCATGGCAAA           |   |
| 946    | GCAAGGTAAGCGCCCAACT            | Amplifican un fragmento de 63-pb del gen <i>lp_1036</i> por qPCR  |
| 947    | CCACCATGAGGGTGATCGTT           |   |
| 995    | CCTGACCGGTTTCGAGTGTTAG         | Amplifican un fragmento de 59-pb del gen <i>lp_2940</i> por qPCR  |
| 996    | CATCATGGCCCAGAAAATGAC          |   |
| 1051   | GGGGTACCAACCAGCTTATATGA        | Amplifican un fragmento interno de 376-pb del gen <i>lp_1426</i> que fue digerido con KpnI/XbaI y clonado en el plásmido pUCE191 previamente digerido con KpnI/XbaI para generar pUCE191-lp1426 |
| 1052   | GCTCTAGATGAAAGTCGGTGATCCAA     |   |
| 1150   | GCGGAATCATCCGTTGGA             | Amplifican un fragmento de 58-pb del gen <i>lp_2945</i> por qPCR fuera del área de interrupción   |
| 1151   | ACGAATCGACTTTGGATCATATTG       |   |

| Nombre | Secuencia (5'→3') <sup>a</sup> | Fragmento amplificado/Estrategia de clonaje  |
|--------|--------------------------------|--|
| 1152   | ACTCGGTGCCCAAATTATTCC          | Amplifican un fragmento de 61-pb del gen <i>lp_0271</i> por qPCR fuera del area de interrupción  |
| 1153   | CTGAATGGATTGCGGATGATT          |  |
| 1154   | GGCACCAATGACGGATGAC            | Amplifican un fragmento de 57-pb del gen <i>lp_0272</i> por qPCR fuera del area de interrupción  |
| 1155   | GGATGGGCCTGTAACCAGCTA          |  |
| 1222   | CACTGGTGATGCCAAATATTGAA        | Amplifican un fragmento de 65-pb del gen <i>lp_1424</i> por qPCR fuera del area de interrupción  |
| 1223   | GCCCTGATCATCAAAAGCTTGT         |  |
| 1224   | TCAAGCCGTTGTCCTAGAAAAAT        | Amplifican un fragmento de 58-pb del gen <i>lp_1425</i> por qPCR fuera del area de interrupción  |
| 1225   | CCCAGCGGAACGGTAT               |  |
| 1226   | TGACATCGACTGGCCCAAT            | Amplifican un fragmento de 56-pb del gen <i>lp_1426</i> por qPCR fuera del area de interrupción  |
| 1227   | TGCCCTTTGTCAATGCTTCA           |  |
| 1243   | ATGCAAAAATAATGCCAGTC           | Amplificación con 1233 de un fragmento de ADN de 508-pb para corroborar la inserción correcta de pUCE191- <i>lp1426</i> en el cromosoma de <i>L. plantarum</i> WCFS1 |
| 1325   | AATACGAGTGGTACGCCAAGAAC        | Amplifican un fragmento de 60-pb del gen <i>lp_3665</i> por qPCR fuera del area de interrupción  |
| 1326   | CCATCCCACCGTGGATTC             |  |
| 1224   | CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA         | 24-mer F (-47) para secuenciar pUCE19/ pUCE191 (Biolabs)   |
| 1233   | AGCGGATAACAATTCACACAGGA        | 24-mer R (-48) para secuenciar pUCE19/pUCE191(Biolabs)   |

<sup>a</sup> Los sitios de corte para las enzimas de restricción se presentan subrayados

<sup>b</sup> genes evaluados como posibles controles endógenos para los ensayos de RT-qPCR relativa

El inóculo (1%) se preparó a partir de las cepas mantenidas a -80°C y activadas en medio MRS líquido mediante dos pases consecutivos a 30 °C durante toda la noche sin agitación. Se incluyó un control negativo para cada concentración en el cual se añadió el compuesto pero no se adicionó inóculo.

La solución a partir de la cual se realizaron las diluciones seriadas se preparó en presencia de etanol para el caso del ácido *p*-cumárico por lo que se realizó un ensayo control en el cual se evaluó el efecto en el crecimiento de la presencia de etanol a concentraciones crecientes de 0,7; 1,4; 2,8 y 5,5%. Tanto la solución de ácido gálico como de *p*-cumárico se filtraron a través de un un filtro Millipore de 0,2 µm antes de añadirlas al medio de ensayo esterilizado previamente.

Los tubos se incubaron a 30 °C y se registró la ausencia/presencia de crecimiento a las 24 y 48 horas. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se definió como la concentración más baja del compuesto a la cual no se observó crecimiento. Cada concentración fue ensayada por triplicado.

### 3.2.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS MUTANTES VS. LA CEPA SILVESTRE (“WILD TYPE”) DE *L. PLANTARUM* WCFS1

El efecto de los ácidos gálico y *p*-cumárico fue evaluado estudiando el crecimiento de cepas mutantes de *L. plantarum* WCFS1 a las cuales se les interrumpieron por recombinación homóloga (ver punto 3.3.9.) los genes *lp\_2945* (*lpdC*) o *lp\_3665* (*pdC*) relacionados con el metabolismo de los compuestos fenólicos estudiados. Para ello se prepararon cultivos por triplicado en 50 ml de medio MRS líquido sin suplementar con antibióticos al cual se adicionó el inóculo a razón de 0,01%. Este inóculo se obtuvo a partir de las cepas mantenidas a -80 °C realizando la activación de igual forma a lo descrito en el punto 3.2.1. y en presencia de los antibióticos correspondientes (10 µg/ml de eritromicina y 100 µg/ml de lincomicina). Los estudios se realizaron comparando el crecimiento de los mutantes con respecto a la cepa silvestre (WT). El incremento en la biomasa en el tiempo se monitoreó midiendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro BOECO S-22 UV/VIS (Boeckel &Co.) durante 12 horas, cada hora las primeras 5 y cada 30 minutos en el periodo restante. Se realizaron mediciones adicionales a las 24 horas.

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de correlación exponencial con la finalidad de ajustar el crecimiento bacteriano a un modelo matemático y poder comparar los cambios en la velocidad de crecimiento. Los datos se ajustaron a la ecuación  $Y = M * E^{rx}$  donde, Y es el incremento de la biomasa, M es la biomasa inicial, r es la tasa de crecimiento instantáneo, x el tiempo t y E la constante del modelo matemático,  $E = 2,71828$ ) y los coeficientes de correlación  $R^2$  se calcularon para cada caso en un modelo sencillo cuya finalidad se centró en la comparación del comportamiento de la población de células silvestres vs. el comportamiento de las células mutantes, más que en la validación o estimación de un modelo predictivo matemático (Valbuena *et al.*, 2005; Reverón *et al.*, 2009; Buzrul, 2009). La cepa mutante WCFS1Δ*lp\_1426* se usó como control de la mutación en los estudios del efecto del ácido gálico, mientras que en presencia de ácido *p*-cumárico se empleó el mutante WCFS1Δ*lp\_2942*, debido a que los genes *lp\_1426* y *lp\_2942* no están relacionados con la degradación de cada compuesto respectivamente.

Para observar la evolución del crecimiento y validar la presencia de la mutación a lo largo de todo el tiempo de experimentación se tomaron alícuotas en condiciones estériles a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas, posteriormente cada 30 min hasta las 12, y a las 24 horas de incubación. Para cada alícuota se realizó el recuento de bacterias viables realizando las diluciones

requeridas y plaqueando en medio MRS agar con y sin antibióticos añadidos. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas y se comparó el recuento de colonias entre los dos grupos. En las cepas mutantes, un recuento equivalente entre las colonias crecidas en agar con antibiótico y sin antibióticos indicó que la mutación no reversionó durante el estudio.

### **3.3. TÉCNICAS DE ADN**

#### **3.3.1. EXTRACCIÓN DEL ADN BACTERIANO**

El ADN cromosómico se extrajo a partir de bacterias cultivadas en 10 ml de medio MRS líquido a 30 °C sin agitación. El cultivo se centrifugó a 2700 x g durante 15 min a temperatura ambiente y las células sedimentadas se lavaron en 500 µl de TES (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 100 mM NaCl). El sedimento se resuspendió en 600 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA) conteniendo 10 mg/ml de lisozima (Sigma) y se incubó durante 30 min a 37 °C en baño de agua. Posteriormente se añadieron 70 µl de una solución de SDS al 10% y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma) y se agitó suavemente por inversión manual. Después de la lisis, el ADN se purificó mediante dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). En cada extracción las fases se separaron mediante centrifugación a 16090 g durante 15 min en microcentrífuga Universal 32 R (Hettich). La fase superior se separó y se le añadió NaCl 5 M en proporción 1:25. Seguidamente se añadieron dos volúmenes de etanol 99% frío (-20 °C) para precipitar el ADN cromosómico (Vaquero *et al.*, 2004). El precipitado se lavó con una solución de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último el ADN seco se disolvió en tampón TE (Sambrook *et al.*, 1989) y se almacenó a -20 °C. El ADN así obtenido se utilizó para amplificar los fragmentos de los genes de interés mediante PCR.

#### **3.3.2. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN MEDIANTE PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo empleando los reactivos suministrados por Applied Biosystems (Roche), exceptuando los oligonucleótidos que fueron sintetizados por Eurofins MWG GmbH y los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) que se adquirieron a Amersham Pharmacia Biotech.

Las reacciones de amplificación se prepararon en un volumen final de 25 o 50  $\mu\text{l}$  conteniendo la enzima ADN polimerasa termoestable *AmpliTaqGold*<sup>TM</sup> a una concentración en la mezcla final de 0,025 U/ $\mu\text{l}$  (Applied Biosystems, Roche) o *Pfu Turbo*®, a una concentración final de 0,05 U/ $\mu\text{l}$  (Stratagene), según las instrucciones de fabricante. La mezcla de reacción para la primera enzima contenía  $\text{MgCl}_2$  2 mM y el tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, 50 mM KCl (1X). Cuando se utilizó la polimerasa *PfuTurbo*® la mezcla de reacción consistió en  $\text{MgSO}_4$  2 mM, tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, 50 mM KCl, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Tritón X-100 0,1% con albúmina de suero bovino (BSA) 0,1 mg/ml libre de nucleasas. En ambos casos se empleó una mezcla de dNTPs a una concentración final de 0,25 mM de cada uno de ellos en la reacción y los oligonucleótidos a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$ . La cantidad del ADN molde empleada fue de aproximadamente 10 ng. La amplificación se realizó indistintamente en dos termocicladores: Eppendorf Mastercycler personal 5332 o Eppendorf Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf AG). Las reacciones consistieron en 30 ciclos de tres fases cada uno: desnaturalización del ADN a 95 °C durante 1 min; seguido de una fase de hibridación de 1 min a 50-52 °C (dependiendo de los oligonucleótidos utilizados) y una fase de elongación o síntesis de ADN realizada a 72 °C para la *AmpliTaqGold*<sup>TM</sup> y a 68 °C para la polimerasa *Pfu Turbo*® durante un tiempo proporcional al tamaño del fragmento a amplificar. Finalmente se aplicó una temperatura de 72 °C durante 10 min para garantizar la síntesis completa de cada copia. En la reacción realizada con la ADN polimerasa *AmpliTaqGold*<sup>TM</sup> se introdujo una etapa previa de 95 °C durante 10 min para su activación puesto que esta enzima se suministra en estado inactivo.

### 3.3.3. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

La separación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR se realizó en función de su tamaño, mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (fragmentos >1000 pb) o 2% (fragmentos  $\leq$  1000 pb) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). A cada producto de reacción de PCR (25-50  $\mu\text{l}$  totales) se le añadieron 5-10  $\mu\text{l}$  de una solución compuesta por azul de bromofenol 0,25%, xilencianol FF 0,25% y glicerol 30% en agua. El TAE se utilizó como tampón electrolito. La electroforesis se realizó a 5 V/cm durante un tiempo variable, determinado por la migración del marcador hasta 2,5 cm del borde inferior del gel. Una vez finalizada la migración se procedió a teñir los geles con GelRed<sup>TM</sup> 3X en 0,1 M NaCl (VWR). Los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación

ultravioleta ( $\lambda=302$  nm) en un transiluminador Vilber Loumat TFP-10M. Como marcadores de tamaño se utilizaron el 100 pb “Ladder” (BIOTOOLS) 0,5 mg/ml; el ADN del fago Lambda cortado con *HindIII* (Roche) 100  $\mu$ g/ml; o el ADN del fago Lambda cortado con *EcoT14I* (Takara Bio Inc.) 83  $\mu$ g/ml . En cada caso se aplicaron 0,25-0,30  $\mu$ g totales del marcador.

### 3.3.4. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Después de la electroforesis las bandas de ADN se purificaron empleando los reactivos *QIAquick Gel Extraction Kit* (QUIAGEN<sup>TM</sup>) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, al terminar la separación electroforética, los fragmentos de ADN de interés se visualizaron bajo luz ultravioleta y se cortaron empleando un bisturí. El trozo conteniendo la banda se pesó y colocó en tampón QG que contiene tiocianato de guanidina. Después de una incubación a 55 °C durante 10 min, la mezcla se cargó en la columna y se centrifugó a 18890 g durante 1 min en microcentrífuga Universal 32R (Hettich). La columna se lavó una vez más con tampón QG y dos veces con tampón PE conteniendo etanol, en las mismas condiciones. Una vez eliminados los restos de etanol en su totalidad, el ADN se recuperó añadiendo 50-100  $\mu$ l de tampón de elución EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) o agua de biología molecular (Sigma).

El ADN purificado, antes de su corte con enzimas de restricción y/o de su secuenciación, se visualizó nuevamente bajo idénticas condiciones a las descritas en el punto 3.3.3.

### 3.3.5. SECUENCIACIÓN DEL ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en la empresa SECUGEN (<http://www.secugen.es>), empleando un secuenciador automático Abi Prism 377<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) con el sistema de secuenciación *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems). Los productos purificados se secuenciaron con oligonucleótidos propios (Tabla V) y los plásmidos recombinantes con el oligonucleótido F17 (M13 (-20): 5'd(GTAAAACGACGGCCAGT)3' -17 mer; SECUGEN).

### 3.3.6. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Los estudios de similitud entre secuencias se llevaron a cabo a través del sistema de “Búsqueda Básica Local de Alineación BLAST” (por sus siglas en inglés) de la red de servicio del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI) de acuerdo al algoritmo de Altschul *et al.* (1990). Las secuencias de nucleótidos contenidas en la base de datos del EMBL/GenBank se emplearon como referencia (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

Los alineamientos y las comparaciones de las secuencias se realizaron utilizando los paquetes de programa BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) y/o Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).

### 3.3.7. MANIPULACIÓN DEL ADN CON ENZIMAS DE USO COMÚN EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Las enzimas de restricción (Boehringer Mannheim, Biolabs Inc., Roche, GE Healthcare-Amersham y Stratagene) y la enzima T4 ADN Ligasa (USB products), se utilizaron empleando los tampones y condiciones establecidas por cada fabricante (<http://atm.skkumed.ac.kr/protocol/Sure%20Cut%20buffer.pdf> y/o [http://www.fermentas.de/admin/images/media/labaid\\_rebuffers\\_LRE1.pdf](http://www.fermentas.de/admin/images/media/labaid_rebuffers_LRE1.pdf)).

### 3.3.8. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Las cepas de *E. coli* (DH5 $\alpha$  o DH10B) conteniendo el plásmido de interés se cultivaron a 37 °C durante 24 h en caldo LB al que se añadió ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml. El cultivo (4 ml) se centrifugó 2 min a 18890 g. El pellet obtenido se procesó empleando el sistema comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) según las indicaciones del fabricante. Finalmente, el ADN plasmídico se eluyó con agua en lugar del “tampón de elución” para evitar los problemas relativos a la presencia de sales durante el proceso de transformación por electroporación.

### 3.3.9. CLONAJE DE GENES EN EL VECTOR PUCE191

La interrupción de genes se realiza con la finalidad de verificar el papel de éstos en el metabolismo de un organismo. Las interrupciones de los genes en el cromosoma de *L. plantarum* se realizaron mediante inserción-duplicación por recombinación homóloga y para



ello se amplificaron fragmentos internos de los genes de interés mediante PCR y se clonaron en el vector pUCE191 (Arrecubieta *et al.*, 1995). Los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones se diseñaron incorporando las dianas de restricción *KpnI* y *XbaI* (Tabla IV). El plásmido pUCE191 y los productos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* a 37 °C durante toda la noche utilizando los tampones recomendados por el fabricante. Su tamaño se verificó en geles de agarosa y se purificaron según se detalla en los apartados 3.3.3 y 3.3.4 para su posterior unión con la enzima T4 ADN Ligasa (USB) a 16 °C durante 18 h. Los productos de la ligación se emplearon seguidamente para transformar células competentes de *E. coli* DH10B.

### 3.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *E. COLI*

La transformación genética de *E. coli* se realizó empleando células competentes según el método propuesto por Hanahan (1983) que utiliza cloruro de rubidio. Brevemente, las células se cultivaron en medio LB a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,4-0,6 a 600 nm y el crecimiento se detuvo mediante la introducción del cultivo en un baño de agua/hielo durante 30 min. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 2450 g durante 5 min a 4 °C. El sedimento celular se suspendió en tampón TfBI (RbCl 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; KOAc 30 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; Glicerol 15%) y se incubó durante 2 h en hielo. Pasado este tiempo se realizó una segunda centrifugación, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en tampón TfBII (MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; Glicerol 15%). Las células competentes así preparadas se repartieron en alícuotas de 200 µl y almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La transformación de las células competentes se realizó incubándolas con 70-100 ng del plásmido pUCE191 a 42 °C durante 2 min y enfriando rápidamente en baño agua/hielo durante 1-2 min. Posteriormente se añadió a la mezcla 1 ml de medio SOC y se incubó a 37 °C durante 1 hora con agitación. Después de la transformación las células se plaquearon en agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml), isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) utilizado como el inductor artificial del operón *lac* y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal), y se incubaron a 37 °C durante 16-18 h (Sambrook *et al.*, 1989).

La selección de las colonias transformadas se realizó atendiendo a la coloración que éstas presentaban. Los vectores de la serie pUC llevan un segmento corto de ADN de *E. coli*

que contiene las secuencias regulatorias y la información que codifica los primeros 146 aminoácidos del gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*). Dentro de esta región está localizado un sitio de clonación múltiple que no interrumpe el marco de lectura pero ocasiona la adición de un número pequeño de aminoácidos en el extremo amino-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa. Ni el fragmento de ADN codificado por la célula huésped ni el que está presente en el plásmido son activos individualmente, sin embargo al asociarse se complementan y dan origen a una proteína con actividad enzimática. Durante la transformación de *E. coli* con plásmidos como el pUCE191 ocurre un fenómeno de  $\alpha$ -complementación en el cual las células mutantes que carecen de un segmento próximo al operador del gen *lacZ* son complementadas por mutantes  $\beta$ -galactosidasa negativos que tienen la región próxima al operador intacta (Sambrook *et al.*, 1989). Las colonias de *E. coli* Lac<sup>+</sup> que resultan de la  $\alpha$ -complementación son fácilmente reconocibles porque presentan coloración azul en presencia del sustrato X-gal debido a su transformación un producto de color azul insoluble (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo). Sin embargo, la inserción de ADN foráneo en el sitio de clonación múltiple del plásmido pUCE191 casi invariablemente resulta en la producción de un fragmento amino-terminal que no es capaz de llevar a cabo la  $\alpha$ -complementación y en consecuencia las células de *E. coli* que llevan el plásmido recombinante son de color blanco.

### **3.4.1. VERIFICACIÓN RÁPIDA DE LA PRESENCIA DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS**

La probabilidad de obtener células de *E. coli* de coloración blanca que no lleven el plásmido recombinante es muy baja. Sin embargo, se puede hacer uso de un procedimiento de extracción de plásmidos a partir de las colonias cultivadas en placas de agar (“minipreps” de colonias) diseñado para verificar la clonación de un gen cuando se llevan a cabo los protocolos destinados a producir proteínas recombinantes (Sekar, 1987). Brevemente, con una punta amarilla de micropipeta se tomó una pequeña cantidad de biomasa de una colonia de color blanco y se colocó en 20  $\mu$ l de una solución de lisis conteniendo lisozima 0,5 mg/ml; EDTA 25 mM, pH 8; Tris-HCL 25 mM, pH 7,5; ARNasa 0,1 mg/ml; azul de bromofenol 0,02% (p/v) y glicerol 0,115% (v/v). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se añadieron 5  $\mu$ l de fenol-sevag (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, 25:24:1) y se mezcló vigorosamente en vortex 1-2 min. Se centrifugó a 18890 g durante 2 minutos para separar la fase orgánica (inferior) de la acuosa (superior) que contiene el ADN y

se colocaron 10 µl de ésta última en un gel de agarosa 0,7% (p/v) para realizar una separación mediante electroforesis convencional y tinción con GelRed™, en condiciones idénticas a las descritas en el punto 3.3.3. Los plásmidos recombinantes de interés se seleccionaron según el tamaño comparando con el plásmido pUCE191 control de menor tamaño (sin el inserto).

### **3.5. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *L. PLANTARUM***

La transformación genética de *L. plantarum* se realizó según el método propuesto por Aukrust y Blom (1992). La cepa WCFS1 de *L. plantarum* se cultivó en medio MRS modificado (MRS\*) sin glucosa (fuente de carbono) y con adición del aminoácido glicina a una concentración de 1% durante 18 h a 30 °C sin agitación. En las células Gram positivas estas modificaciones ocasionan una disminución en los entrecruzamientos del peptidoglicano, debilitando la pared celular y aumentando su permeabilidad (Hammes *et al.*, 1973). Cuando la densidad celular alcanzó una DO de 0,25 a 600 nm, se añadió glucosa (a una concentración final de 1%) y se continuó la incubación hasta que el cultivo alcanzó una DO de 0,6. El crecimiento se detuvo mediante su incubación en un baño de agua/hielo durante 20 min, el cultivo se centrifugó a 3000 g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron en MgCl<sub>2</sub> (1 mM) seguido de un lavado con polietilenglicol (PEG-1500, 30%). Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en PEG-1500 al 30% en una centésima parte del volumen del cultivo inicial.

Las células competentes de *L. plantarum* así obtenidas se transformaron mediante electroporación utilizando un equipo Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad). Brevemente, 40 µl de las células competentes y 4 µl de los plásmidos recombinantes derivados del pUCE191 se añadieron en una cubeta de electroporación previamente enfriada. La cubeta se colocó en la cámara de choque y se aplicó un pulso de resistencia igual a 400 ohm, capacitancia de 25 µF y voltaje de 1500 V con 2 mm de distancia (separación entre las paredes de la cubeta). Inmediatamente se añadió a la mezcla 500 µl de MRS suplementado con 0,5 M de sacarosa y 0,1 M de MgCl<sub>2</sub> y se incubó a 30 °C en baño de agua durante 2 h sin agitación (periodo de recuperación celular). Una vez finalizado este periodo, las células transformadas se seleccionaron en placas de agar MRS suplementadas con eritromicina (10 µg/ml) y lincomicina (100 µg/ml) sembrando en superficie e incubando a 30 °C hasta la aparición de colonias.

## 3.6. TÉCNICAS DE ARN

### 3.6.1. EXTRACCIÓN DEL ARN BACTERIANO

#### 3.6.1.1. EXPOSICIÓN DE LOS CULTIVOS DE *L. PLANTARUM* WCFS1 A LOS ÁCIDOS GÁLICO Y *P*-CUMÁRICO

Las células de *L. plantarum* WCFS1 mantenidas a -80 °C se activaron en caldo MRS mediante dos pases consecutivos sin agitación a 30 °C por un periodo de 16-18 h. Se prepararon cuatro lotes independientes de cultivos que incluyeron muestras control y prueba. Cada lote constó de tres cultivos del grupo “control”, sin adición del compuesto fenólico, y tres cultivos del grupo de “prueba”, con adición del compuesto fenólico a ensayar, para un total de 24 extracciones de ARN (12 por cada grupo). El efecto del ácido gálico se evaluó a dos concentraciones: 1,5 mM y 15 mM, éste último valor es cerca de 10 veces inferior a la concentración mínima inhibitoria descrita para *L. plantarum* (Landete *et al.*, 2008 y este estudio, ver Resultados y Discusión). La respuesta al ácido *p*-cumárico se evaluó a 1,5 mM lo que también representa aproximadamente 10 veces menos el valor de su concentración mínima inhibitoria. Las células se cultivaron en medio MRS empleando un volumen final de 50 ml y un inóculo del 2%. Cuando la biomasa del cultivo llegó a una DO de 0,8-0,9 a 600 nm se adicionó el compuesto fenólico en estudio y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo los cultivos se colocaron en un baño de agua/hielo durante 7 min y se centrifugaron a 4630 g a 4 °C durante 5 min en una centrífuga Sorvall RC 6 Plus (Thermo Scientific).

#### 3.6.1.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN

Para la extracción del ARN se siguió el protocolo de Bron *et al.* (2006). Después de la centrifugación del cultivo el sedimento celular se homogeneizó en 4 volúmenes (1 ml) de tampón HEPES 66,7 mM en metanol 60%, pH 6,5 (“Buffer Quenching”) (Pieterse *et al.*, 2006) en frío (-20 °C), con lo cual se logró disminuir el metabolismo celular y preservar la cantidad de ARN. Posteriormente, la biomasa celular se separó mediante centrifugación a 11180 g durante 10 min a 0 °C y con ayuda de un asa de siembra se trasvasó a un vial con la mezcla de extracción conteniendo 400 µl fenol ácido, pH 4,5, 100 µl de cloroformo, 30 µl de SDS 10%, 30 µl acetato de sodio 3M, pH 5,2, 400 µl de tampón TE y 500 mg de esferas de vidrio (425-600 micrones, SIGMA) previamente tratadas con ácido nítrico 66% durante 48 h

a temperatura ambiente y lavadas con agua libre de nucleasas (agua DEPC; Sambrook *et al.*, 1989). La suspensión celular resultante se sometió a tres ciclos de agitación en un equipo FastPrep™ Fp120 (SAVANT) a 5000 rpm durante 40 s. Entre cada ciclo de agitación los viales se enfriaron durante 2 min en nieve carbónica. El lisado obtenido se centrifugó a 18890 g durante 2 min a 4 °C y se eliminaron los restos de proteínas del sobrenadante mediante dos extracciones sucesivas con 500 µl y 400 µl de cloroformo atemperado a 4 °C. Finalmente, se recogió la fase superior acuosa y en los casos que fue necesario se purificó el ARN mediante el sistema *RNeasy Mini Kit*® (QUIAGEN).

### 3.6.2. CONCENTRACIÓN, PUREZA Y CALIDAD DEL ARN

La concentración y pureza del ARN se valoró en un espectrofotómetro Nano Drop 2000™ (Thermo Electron Corporation). La concentración de cada muestra se determinó empleando el valor de densidad óptica a 260 nm y aplicando la fórmula de cálculo RNA-40 (cálculos realizados directamente en el equipo) la cual considera la fracción de proteínas y los restos de fenol trazas en función del valor de DO a 280 nm y a 230 nm, respectivamente. La calidad del ARN se puede estimar observando los cocientes de  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ , donde se consideran óptimos aquellos valores entre 1,8-2,0, siendo deseable que el cociente de  $A_{260}/A_{230}$  sea un poco mayor al de  $A_{260}/A_{280}$ .

El ARN también se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Las muestras se prepararon mezclando 2 µl de ARN, 1,5 µl de la solución compuesta por azul de bromofenol 0,25%, xilencianol FF 0,25% y glicerol 30% en agua DEPC y 4,5 µl de tampón TE. Tanto el tampón TAE como SE TE prepararon garantizando la ausencia de nucleasas en la solución. La electroforesis se realizó en idénticas condiciones a las descritas en el punto 3.3.3. En el ARN de calidad se observa únicamente las dos bandas correspondientes al ARN de las subunidades 23S y 16S ribosómicas en igual intensidad. La banda correspondiente al ARN de la subunidad 5S no se observó en la mayoría de las muestras. La presencia de un mayor número de bandas o “desaparición” (pérdida de intensidad) de la banda 23S se consideró indicativo de degradación del ARN.

### **3.6.3. TRATAMIENTO DEL ARN PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS TRAZAS DE ADN CONTAMINANTE**

La presencia de trazas de ADN en el ARN purificado es habitual, siendo imprescindible eliminarlo para evitar que los niveles de la expresión génica sean sobreestimados (cuando las muestras del grupo de prueba tienen trazas de ADN) o subestimados (si son las muestras del grupo control las que poseen ADN contaminante). El ADN se eliminó empleando la enzima deoxirribonucleasa (DNasa) y siguiendo las instrucciones del estuche comercial *DNA-free*<sup>TM</sup> (Ambion). Brevemente, 50 µg de ARN en un volumen final de 100 µl se incubaron con 2 µl de la enzima DNasa I a 37 °C durante 1 h, seguidamente se añadieron 2 µl más de la enzima y se incubó en las mismas condiciones. En los casos que fue necesario se realizó una tercera incubación con 1 µl adicional de la enzima a la misma temperatura durante 30 min. Por último, a la mezcla se añadieron 20 µl del “reactivo de inactivación”, se incubó de 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 18890 g durante 1 min para recuperar en el sobrenadante el ARN limpio (aprox. 90 µl). La eliminación total del ADN se verificó por PCR en un ensayo que incluyó controles positivos (con ADN de *L. plantarum* WCFS1 y ARN sin tratar con DNasa como molde) y controles negativos (sin ADN molde) mediante la no amplificación del gen ADNr 16S en las muestras de ARN tratadas. Antes de realizar la síntesis del ADN copia se evaluó nuevamente la concentración, pureza y calidad del ARN según lo descrito en el punto 3.6.2.

## **3.7. ESTUDIO TRANSCRIPCIONAL**

### **3.7.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL MEDIANTE MICROMATRICES DE ADNc**

Tanto la síntesis, el marcaje y la incorporación de los fluorocromos, como la hibridación y la corrección y normalización de los datos se realizaron en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología.

#### **3.7.1.1. SÍNTESIS DEL ADN COPIA, MARCAJE E INCORPORACIÓN DE LOS FLUOROCROMOS**

La calidad final de las muestras de ARN se evaluó en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología mediante electroforesis en nanocapilares en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). La sensibilidad de este ensayo es superior e

indica la integridad del ARN con mayor fiabilidad. Aquellas muestras de ARN total donde la relación 23S/16S fue igual o mayor que 1 y que no presentaron productos de degradación de bajo peso molecular se seleccionaron para la síntesis del ADN copia (ADNc) utilizándose los reactivos contenidos en el estuche *SuperScript Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen, L1014-02) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los compuestos fluorescentes Cy3 (verde, 543 nm) e HyPer5 (rojo, 664 nm) (Amersham Biosciences, 28-9224-19) se acoplaron al ADNc y las sondas marcadas con ambos fluorocromos se purificaron empleando los reactivos contenidos en el sistema comercial *CyScribe GFX Purification Kit* (Amersham Biosciences, 27-9606-01).

La eficiencia en la incorporación de los fluorocromos se evalúa determinando a 260 nm la producción de ADNc y a 550 nm y 664 nm la cantidad incorporada de Cy3 e Hyper5, respectivamente. Durante la cuantificación de los ácidos nucleicos se aplica un factor de corrección debido a que Hyper5 muestra cierto nivel de absorción a 260 nm (Amersham Biosciences, 28-9231-83).

### 3.7.1.2. PLATAFORMA DEL ENSAYO: LA MICROMATRIZ

En este estudio se diseñó a medida la plataforma “*Lactobacillus plantarum* WCFS1 8x15K microarray GE Agilent G2509F Oligo Microarrays” (Formato IS-15744-8-V1, No. 026636) con la micromatriz, la cual consta de ocho zonas de hibridación de alta definición donde se imprimieron los oligonucleótidos cebadores (para un máximo de capacidad de 15477 sondas en cada zona). La micromatriz está provista de oligonucleótidos que representan todo el genoma de la especie en estudio y contiene un promedio de tres sondas por cada gen. Las sondas de 60-mer se diseñaron según la secuencia del genoma de la cepa WCFS1 de *L. plantarum* (Acc. Nr. AL935263.2) y se tomaron de la base de datos “The Gene Expression Omnibus” con número de acceso GEO Acc. Nr. GPL5874 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL5874>) (Kleerebezem *et al.*, 2003; Molenaar *et al.*, 2005; Siezen *et al.*, 2011).

En el diseño de la micromatriz se incluyeron como “controles propios”, por triplicado, las sondas correspondientes a los genes *lp\_2057* (*ldhD*, que codifica la D-lactato deshidrogenasa), *lp\_2528* (que codifica una dioxigenasa “ring-cleaving” tipo I), *lp\_0271* (*lpdB*, que codifica la subunidad B de la descarboxilasa de ácidos aromáticos), *lp\_0272* (*lpdC*, que codifica la subunidad D de la descarboxilasa de ácidos aromáticos), *lp\_2943* (proteína de transporte de cationes), *lp\_2945* (*lpdC*, que codifica la subunidad C de la descarboxilasa de

ácidos aromáticos), *lp\_2953* (esterasa), *lp\_2956* (tanasa), *lp\_3054* (bencil alcohol deshidrogenasa), *lp\_3525* (6-fosfo-beta-glucosidasa), *lp\_3629* (beta-galactosidasa) y *lp\_3665* (*pdc*, que codifica la descarboxilasa de los ácidos fenólicos PAD); así como también los “controles internos” indicados por *Agilent Technologies* (GE\_BrightCorner, DarkCorner, entre otros); ubicados al azar en el diseño de la matriz.

### 3.7.1.3. HIBRIDACIÓN

La preparación de las sondas e hibridación de las mismas se realizó como se describe en el manual “Two-color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol” (*Quick Amp Labeling with Tecan HS Pro Hybridization V. 5.7*, Agilent Technologies, G4140-90051). Para ello las sondas Cy3 e Hyper5 se colocaron en contacto con un agente bloqueante (10x *Blocking Agent*) en un tampón de fragmentación (25x *Fragmentation Buffer*) y se incubó a 60 °C durante 30 min exactos. Posteriormente se añadió el tampón de hibridación (2x *GEX Hybridization Buffer HI-RPM*), y la mezcla se colocó en la zona de la micromatriz. La hibridación se llevó a cabo a 65 °C durante 17 horas y pasado este tiempo, se realizaron los lavados requeridos (*GE Wash Buffer 1* y *2*) a 37 °C. Por último, la plataforma se secó previo a realizar el escaneado y digitalización. Las imágenes de los canales Cy3 e Hyper5 se equilibraron y capturaron con un escáner GenePix Scanner 4000B (Axon, Molecular Devices). La intensidad de cada punto se cuantificó mediante la herramienta informática GenPix (Axon).

### 3.7.1.4. CORRECCIÓN, NORMALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

De manera habitual en un análisis de un solo canal, la medición de la señal de cada punto se filtra siguiendo el criterio  $I/B \geq 3$  e  $(I-B) / (S_I + S_B) \geq 0,6$ , donde I y B representan la medida de las intensidades de señal y de fondo, respectivamente, y  $S_I$ ,  $S_B$  sus desviaciones estándares.

El software de análisis de imágenes para micromatrices de dos canales (rojo y verde) da como producto para cada punto de la matriz dos intensidades rojas  $R_f$  y  $R_b$  (señal y fondo) y dos intensidades verdes  $G_f$  y  $G_b$  (señal y fondo). La corrección del fondo se realizó por el método “normexp” que modela las intensidades de los puntos como la suma de dos variables aleatorias: una cuya distribución se ajusta a la “normal” y otra distribuida



“exponencialmente”, representando el ruido de fondo (B) y la señal (S), respectivamente (Silver, 2009). Según este modelo la señal para el canal rojo se calcula como  $R_f = R_b + B + S$ , donde S es la señal verdadera de la intensidad de la expresión y B es el fondo residual no capturado por  $R_b$ . El modelo para el canal verde es equivalente y se calcula de forma similar. Se asumió que todas las variables eran independientes.

Una vez corregida la intensidad del fondo, se aplicó una normalización de los datos mediante el método de “loess” usando LIMMA (Smyth y Speed, 2003; Smyth, 2004), que es parte de un proyecto de lenguaje R denominado *Bioconductor*. Se evaluó la expresión diferencial de los genes a partir de modelos lineales mediante un test estadístico t moderado de Bayes que incluye múltiples replicados (Smyth, 2004) y se empleó la tasa de descubrimientos erróneos (“False Discovery Rate”, FDR) para establecer la expresión diferencial de cada gen en comparación al control. Los valores p se corrigieron mediante el método de Benjamani y Hochberg (1995) y la tasa FDR se controló para que fuese menor al 5%.

Se consideró que un gen se expresaba diferencialmente frente al compuesto utilizado cuando los valores nominales p fueron menores de 0,05 ( $FDR < 0,05$ ) y el cambio absoluto en la intensidad de la señal fue igual o superior a 1,5 veces con respecto al control ( $FC \geq \pm 1,5$  veces). La magnitud del cambio se calculó como el promedio del  $\log_2$ ratio entre las réplicas de las sondas de un mismo gen ( $p < 0,05$ ).

### **3.7.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL**

#### **3.7.2.1. SÍNTESIS DEL ADN COPIA MEDIANTE LA ENZIMA TRANSCRIPTASA INVERSA**

Para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se sintetizó el ADNc a partir del ARN libre de ADN, empleando los reactivos e indicaciones del estuche comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Un total de 1  $\mu$ g de ARN se mezcló con 1  $\mu$ l de la enzima retrotranscriptasa en un volumen final de 20  $\mu$ l de la solución que contenía 2  $\mu$ l de oligonucleótidos cebadores universales (10X), 0,8  $\mu$ l de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (25X), 1  $\mu$ l de inhibidor de nucleasas y 2  $\mu$ l de tampón (10X). La reacción se llevó a cabo indistintamente en un termociclador Mastercycler personal 5332 o en un Mastercycler gradient 5331 (Eppendorf AG) calentando a 25 °C durante 10 min seguido de 2 h a 37 °C y un periodo de inactivación a 85 °C durante 5 seg. En todos los casos se incluyó un control negativo sin ARN molde.

Para el análisis de micromatrices el ADNc se amplificó de manera diferente tal y como se describe en punto 3.7.1.1.

### 3.7.2.2. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES O CEBADORES PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE RT-QPCR

Los oligonucleótidos iniciadores o cebadores utilizados para amplificar los fragmentos de ADN durante la PCR cuantitativa se diseñaron empleando el programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems). Las secuencias de los genes de interés se tomaron de la base de datos GenBank<sup>®</sup> de la red de servicio del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Los parámetros para el diseño fueron los que vienen predeterminados por el programa: temperatura de “melting” ( $T_m$ ) mínima 58 y máxima 60, contenido de GC (%GC) mínimo 30 y máximo 80, longitud del oligonucleótido mínima 9 y máxima 40, estableciendo como óptima 20 y tamaño del amplicón mínimo 50 y máximo 150 bases.

### 3.7.2.3. ENSAYO DE RT-QPCR

Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en el sistema *7500 Fast* (Applied Biosystems). Se utilizó el método que emplea SYBR Green, fluorocromo que se intercala en las moléculas de ADN y permite la visualización directa de los productos de PCR. Este fluorocromo posee una longitud de onda de excitación máxima a 494 nm y de emisión máxima a 521 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado empleando 12,5  $\mu$ l de la mezcla comercial *2x SYBR Green real-time PCR Master Mix* (4309155, Applied Biosystems) que contiene las cantidades necesarias de la enzima *Taq* polimerasa,  $MgCl_2$ , los dNTPs y el colorante SYBR Green, 5  $\mu$ l de cada uno de los oligonucleótidos cebadores específicos (“forward” y “reverse”) a una concentración de 200 mM y 2,5  $\mu$ l del ADNc en dilución 1:1000 para un volumen final de 25  $\mu$ l en agua libre de nucleasas (agua DEPC). La amplificación se inició con una activación inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos donde cada ciclo incluyó dos etapas: una a 95 °C durante 15 s (desnaturalización) y otra a 60 °C durante 1 min (hibridación/elongación) utilizando las condiciones estándares preestablecidas en el equipo. Se incluyeron controles para confirmar la ausencia de formación

de dímeros por parte de los oligonucleótidos (mezcla sin ADNc) y para verificar la ausencia de ADN/ARN contaminante en todos los reactivos utilizados.

El análisis por RT-qPCR en la modalidad de “cuantificación absoluta” se empleó para validar la eficiencia de la enzima transcriptasa inversa en la obtención del ADNc. Para ello se compararon los valores de los ciclos umbrales (Ct) (“cycle threshold”) resultantes de realizar una RT-qPCR empleando los oligonucleótidos 597-598, que amplifican un fragmento del gen ARNr 16S, y utilizando como material molde para la reacción el ARN y el ADNc correspondientes a cada uno de los cultivos (tanto del grupo control sin adición del compuesto, como los de prueba). Un ADNc se consideró óptimo y se utilizó en los análisis de expresión génica por RT-qPCR “relativa” cuando la variación  $Ct_{ADNc} - Ct_{ARN}$  fue igual o superior a 10 ( $\Delta Ct \geq 10$ ).

Paralelamente, todas las parejas de oligonucleótidos se validaron elaborando una curva estándar (o curva patrón) que utiliza los valores Ct resultantes de amplificar por RT-qPCR cantidades decrecientes conocidas del ADN de interés (por ejemplo: 100, 50, 25, 5, 1 y 0,25 ng/ $\mu$ L). En los casos que se disponía, se empleó el ADN del vector pUCE191 conteniendo el fragmento interno de algunos de los genes en estudio (pUCE191-lpdC, pUCE191-lpdB, pUCE191-lpdD, pUCE191-pad); en caso contrario se empleó el propio ADNc. Mediante el análisis de la “curva disociación-temperatura de fusión” ( $T_m$ ) (suministradas por el equipo) y realizando un análisis electroforético en geles de agarosa al 2% se verificó que en todos los ensayos tuvo lugar la amplificación de un único producto con lo cual se descarta la formación de dímeros por parte de los oligonucleótidos. Seguidamente se obtuvieron las gráficas del valor Ct vs. el  $\log_{10}$  de la concentración de ADN y se aplicó un ajuste de regresión lineal con el cálculo de los coeficientes de correlación ( $R^2$ ). La ecuación de cada recta se utilizó para obtener el valor de la pendiente (que debe ser negativo e inferior a -3,15), y éste se empleó para calcular la eficiencia de la reacción (E) para cada pareja de oligonucleótidos mediante la ecuación  $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$  (Pfaffl, 2001) (El paquete informático que posee el instrumento 7500 *Fast* de la compañía Applied Biosystems posee las herramientas para realizar estos cálculos y obtener las gráficas descritas).

Las variaciones en el nivel de transcripción de los genes se evaluaron mediante un ensayo de RT-qPCR en la modalidad de “cuantificación relativa”. La expresión de cada gen se normalizó frente al gen seleccionado como “control endógeno”. Seis genes descritos como constitutivos (genes “housekeeping”) en diversas especies de *Lactobacillus* (Marco y Kleerebezem, 2007; Duary *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011) y entre los que se encuentran ARNr 16S, *ldhD*, *gapB*, *dnaG*, *gyrA* y *rpoD* se probaron para verificar que su expresión era estable

bajo las condiciones utilizadas en este estudio (Pfaffl, 2001). Se ha descrito que la presencia en el medio de cultivo de sustancias antimicrobianas u oxidantes puede alterar la expresión de genes constitutivos debido al daño en los ácidos nucleicos, de hecho estudios de proteómica realizados para conocer el efecto del ácido tánico en *L. plantarum* WCFS1 demuestran una alteración en la proteína D-lactato deshidrogenasa codificada por el gen *ldhD* (Curiel *et al.* (2011). Se realizó el análisis de la estabilidad de los genes endógenos comparando la variación de los valores Ct con la herramienta “Cotton EST database RefFinder” que integra las plataformas bioinformáticas geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), Normfinder (Andersen, *et al.*, 2004), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), y el método comparativo  $\Delta$ Ct (Silver *et al.*, 2006) (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference> / Department of Biology East Carolina University Greenville, NC 27858). Todos los genes analizados excepto *ropD* presentaron excelente estabilidad en sus niveles de expresión, con valores de desviación estándar menores a 0,6 ( $\Delta$ Ct); coeficientes de variación porcentual (CV%) por debajo de 2,5 (Bestkeeper) y valores de estabilidad que no superaron 0,7 unidades (Normfinder y Genorm) (Tabla VI).

El estudio transcriptómico por RT-qPCR evaluó la “expresión relativa de los genes” (RQ) que se obtiene de los cálculos que utilizan el valor del número de ciclos umbral Ct en las ecuaciones que fundamentan el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). El gen *ldhD* se seleccionó como gen endógeno control y el ADNc del grupo control (sin adición del compuesto fenólico) se definió como calibrador (donde el nivel RQ se corrige a 1). Aquellos genes cuyas RQ mostraron valores iguales o superiores a 1,5 veces ( $FC \geq \pm 1,5$  veces) con respecto al control se consideraron que se expresaron diferencialmente. Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas se realizó la comparación de medias mediante una prueba *t* de Student bajo el supuesto de distribución normal para muestras de tamaño pequeño. En los casos en que no fue posible aplicar los supuestos de la distribución *t* de Student se realizó un análisis ANOVA mediante el programa de análisis estadístico SPSS, bajo un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

**Tabla VI.** Análisis de la estabilidad de los genes “housekeeping” o endógenos utilizados durante los ensayos de RT-qPCR. (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>).

[Home](#)   [Methodology](#)   [Statistics](#)   [Search](#)   [Function Category](#)   [Download](#)   [Softwares & Tools](#)   [Contact Us](#)

Search in leonxie by Google

Evaluating Reference Genes Expression>>

**RefFinder** is a user-friendly web-based comprehensive tool developed for evaluating and screening reference genes from extensive experimental datasets. It integrates the currently available major computational programs (**geNorm**, **Normfinder**, **BestKeeper**, and the **comparative ΔCt method**) to compare and rank the tested candidate reference genes. Based on the rankings from each program, it assigns an appropriate weight to an individual gene and calculated the geometric mean of their weights for the overall final ranking.

**Input your data:**

|       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ldhD  | 16S   | gapB  | dnaG  | gyrA  | ropD  |
| 25.51 | 16    | 23    | 29    | 28.54 | 28.41 |
| 25.06 | 15.73 | 22.8  | 28.93 | 29.09 | 28.34 |
| 24.8  | 15.84 | 22.72 | 28.89 | 29    | 28.49 |
| 25.02 | 15.4  | 22.85 | 28.48 | 28.47 | 28.32 |
| 25.12 | 15.37 | 22    | 28.17 | 28.29 | 28.38 |
| 25.01 | 15.3  | 22.24 | 28.41 | 28.41 |       |
| 24.13 | 14.98 | 22.01 | 27.87 | 27.84 | 26.9  |
| 24.75 | 14.91 | 22.15 | 27.96 | 28.06 | 28    |
| 24.23 | 15.89 | 22.4  | 28.64 | 28.13 | 27.78 |
| 26.75 | 16.43 | 23.41 | 29.1  | 28.7  | 28.63 |
| 26    | 16.34 | 23.55 | 29.75 | 28.98 | 28.91 |
| 26.2  | 16.89 | 23.41 | 29.43 | 28.43 | 28.88 |

  [Try example](#)   [remove data](#)

**Ranking Order (Better–Good–Average)**

| Method                                   | 1           | 2           | 3          | 4           | 5           | 6           |
|--|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Delta CT                                 | gapB        | dnaG        | 16S        | gyrA        | ldhD        | ropD        |
| BestKeeper                               | gyrA        | gapB        | dnaG       | 16S         | ldhD        | ropD        |
| Normfinder                               | gapB        | 16S         | dnaG       | ldhD        | gyrA        | ropD        |
| Genom                                    | gapB   dnaG | 16S         | gyrA       | ldhD        | ropD        |             |
| <b>Recommended comprehensive ranking</b> | <b>gapB</b> | <b>dnaG</b> | <b>16S</b> | <b>gyrA</b> | <b>ldhD</b> | <b>ropD</b> |

Comprehensive Ranking           

Genes Geomean of ranking values

gapB 1.19  
dnaG 2.06  
16S 2.91  
gyrA 2.99  
ldhD 4.73  
ropD 6.00

Comprehensive Ranking           

Genes Average of STDEV

gapB 1.88  
dnaG 1.89  
16S 1.92  
gyrA 2.03  
ldhD 2.05  
ropD 8.08

Comprehensive Ranking           

Gene name Stability value

gapB 0.105  
16S 0.122  
dnaG 0.151  
ldhD 0.586  
gyrA 0.665  
ropD 8.070

Input your data:

| ldhD  | 16S   | gapB  | dnaG  | gyrA  | ropD  |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 25.51 | 16    | 23    | 29    | 28.54 | 28.41 |
| 25.06 | 15.73 | 22.8  | 28.93 | 29.09 | 28.34 |
| 24.8  | 15.84 | 22.72 | 28.89 | 29    | 28.49 |
| 25.02 | 15.4  | 22.85 | 28.48 | 28.47 | 28.32 |
| 25.12 | 15.37 | 22    | 28.17 | 28.29 | 28.38 |
| 25.01 | 15.3  | 22.24 | 28.41 | 28.41 |       |
| 24.13 | 14.98 | 22.01 | 27.87 | 27.84 | 26.9  |
| 24.75 | 14.91 | 22.15 | 27.96 | 28.06 | 28    |
| 24.23 | 15.89 | 22.4  | 28.64 | 28.13 | 27.78 |
| 26.75 | 16.43 | 23.41 | 29.1  | 28.7  | 28.63 |
| 26    | 16.34 | 23.55 | 29.75 | 28.98 | 28.91 |
| 26.2  | 16.89 | 23.41 | 29.43 | 28.43 | 28.88 |

Analyze Try example remove data ?

Ranking Order (Better-Good-Average)

| Method                                   | 1           | 2           | 3          | 4           | 5           | 6           |
|--|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Delta CT                                 | gapB        | dnaG        | 16S        | gyrA        | ldhD        | ropD        |
| BestKeeper                               | gyrA        | gapB        | dnaG       | 16S         | ldhD        | ropD        |
| Normfinder                               | gapB        | 16S         | dnaG       | ldhD        | gyrA        | ropD        |
| Genorm                                   | gapB   dnaG |             | 16S        | gyrA        | ldhD        | ropD        |
| <b>Recommended comprehensive ranking</b> | <b>gapB</b> | <b>dnaG</b> | <b>16S</b> | <b>gyrA</b> | <b>ldhD</b> | <b>ropD</b> |

Comprehensive Ranking Delta CT BestKeeper Normfinder Genorm

| Gene name   | Stability value |
|-------------|-----------------|
| gapB   dnaG | 0.211           |
| 16S         | 0.247           |
| gyrA        | 0.346           |
| ldhD        | 0.423           |
| ropD        | 2.974           |

Comprehensive Ranking Delta CT BestKeeper Normfinder Genorm

CP data of housekeeping Genes by BEST KEEPER

|                      | ldhD  | 16S   | gapB  | dnaG  | gyrA  | ropD         |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| n                    | 12    | 12    | 12    | 12    | 12    | 12           |
| geo Mean [CP]        | 25.20 | 15.75 | 22.71 | 28.71 | 28.49 | 0.00         |
| AR Mean [CP]         | 25.22 | 15.76 | 22.71 | 28.72 | 28.50 | 25.92        |
| min [CP]             | 24.13 | 14.91 | 22.00 | 27.87 | 27.84 | 0.00         |
| max [CP]             | 26.75 | 16.89 | 23.55 | 29.75 | 29.09 | 28.91        |
| std dev [+/- CP]     | 0.60  | 0.48  | 0.46  | 0.46  | 0.31  | 4.32         |
| CV [% CP]            | 2.38  | 3.01  | 2.02  | 1.62  | 1.07  | 16.67        |
| min [x-fold]         | -2.11 | -1.79 | -1.63 | -1.79 | -1.57 | -1.00        |
| max [x-fold]         | 2.92  | 2.21  | 1.80  | 2.05  | 1.51  | 504402435.22 |
| std dev [+/- x-fold] | 1.52  | 1.39  | 1.38  | 1.38  | 1.24  | 19.97        |

Pearson correlation coefficient ( r ) by BEST KEEPER

|         | ldhD  | 16S   | gapB  | dnaG  | gyrA  | ropD |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 16S     | 0.768 | -     | -     | -     | -     | -    |
| p-value | 0.004 | -     | -     | -     | -     | -    |
| gapB    | 0.827 | 0.879 | -     | -     | -     | -    |
| p-value | 0.001 | 0.001 | -     | -     | -     | -    |
| dnaG    | 0.729 | 0.915 | 0.931 | -     | -     | -    |
| p-value | 0.007 | 0.001 | 0.001 | -     | -     | -    |
| gyrA    | 0.493 | 0.517 | 0.654 | 0.733 | -     | -    |
| p-value | 0.104 | 0.085 | 0.021 | 0.007 | -     | -    |
| ropD    | 0.135 | 0.286 | 0.315 | 0.221 | 0.115 | -    |
| p-value | 0.676 | 0.368 | 0.319 | 0.491 | 0.721 | -    |

Pearson correlation coefficient ( r )

BestKeeper vs.

|                     | ldhD  | 16S   | gapB  | dnaG  | gyrA  | ropD  |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| coeff. of corr. [r] | 0.890 | 0.928 | 0.955 | 0.951 | 0.709 | 0.882 |
| p-value             | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.010 | 0.001 |

### **3.7.3. VALIDACIÓN DEL ANÁLISIS DE MICROMATRICES DE ADNc MEDIANTE UN ESTUDIO COMPARATIVO DEL NIVEL DE TRANSCRIPCIÓN POR RT-QPCR**

La validación del análisis de micromatrices de ADNc incluyó los resultados en presencia de ácido gálico 15 mM y de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. Para ello, se estudió la variación en el nivel de transcripción de un grupo de genes mediante un ensayo de RT-qPCR relativa empleando como ADNc molde el obtenido a partir de las mismas muestras de ARN utilizadas para el análisis de las micromatrices. En la validación se incluyeron un grupo de genes que expresaron diferencialmente (con inducción y represión), así como también otro grupo que no presentó un cambio significativo en su regulación: 10 genes para la verificación de los resultados en presencia de ácido gálico y 8 para el ácido *p*-cumárico. La amplificación se realizó en las condiciones descritas en los párrafos precedentes y se aplicaron los cálculos del método comparativo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para obtener los RQ.

La equivalencia entre ambas técnicas se evaluó a través de un estudio de correlación lineal. Los valores de la magnitud del cambio obtenidos para cada gen, tanto por el análisis de micromatrices como por RT-qPCR, se transformaron al logaritmo en base a 2 para obtener los “ratios” o nivel de variación de la expresión. Para cada compuesto, los valores del nivel de variación de la expresión se representaron gráficamente y se ajustó un modelo lineal obteniendo la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Según lo descrito en otros estudios, coeficientes mayores a 0,90 se consideraron indicativos de la existencia de una equivalencia entre ambas técnicas (Hüfner *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011).

### **3.8. ESTUDIO MEDIANTE HPLC DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS CEPAS MUTANTES QUE POSEEN LOS GENES *LPDC* (*LP\_2945*) Y *PDC* (*LP\_3665*) NO FUNCIONALES**

La biotransformación de diversos compuestos fenólicos por BAL se ha estudiado en medios completos (MRS) o mínimos (RPM) que se suplementan con una concentración conocida de cada sustrato y en los cuales se inocula la bacteria de interés permitiendo que ésta crezca durante un tiempo determinado. Transcurrido el periodo de incubación, los compuestos fenólicos se extraen a partir de los sobrenadantes y se analizan mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en función de sus tiempos de retención y espectros de absorción. La ventaja de cultivar las bacterias en medios nutritivos como el MRS es que se excluyen las

variaciones en el patrón de crecimiento debido a la poca disponibilidad de azúcares complejos, péptidos u oligoelementos; sin embargo, estos medios pueden contener cantidades significativas de compuestos fenólicos. En estos casos el empleo de un medio mínimo definido como el RPM garantiza la ausencia de las sustancias o sustratos a evaluar y con ello se evitan tales interferencias.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la interrupción de los principales genes involucrados en el metabolismo de los ácidos gálico y *p*-cumárico, las cepas mutantes WCFS1 $\Delta$ lpdC y WCFS1 $\Delta$ pad, junto con la cepa WT (cepa control) se cultivaron en 10 ml de medio RPM modificado (para detalles ver pto. 3.2) conteniendo una concentración final de 1,5 mM de cada compuesto y suplementado con los antibióticos correspondientes (10  $\mu$ g/ml de eritromicina y 100  $\mu$ g/ml de lincomicina). En el estudio también se incluyeron los ácidos cafeico y ferúlico.

El inóculo se obtuvo a partir de las cepas mantenidas a -80 °C realizando la activación en medio MRS líquido mediante dos pases consecutivos a 30 °C durante toda la noche sin agitación y en presencia de los antibióticos citados en el párrafo precedente. El inóculo (0,01%) se añadió al medio de cultivo y se incubó a 30 °C sin agitación durante 7 días.

Pasado el periodo de incubación las células se sedimentaron por centrifugación y los compuestos fenólicos se extrajeron a partir de 1 ml de los sobrenadantes mediante dos extracciones sucesivas con acetato de etilo (1:0,37). Finalmente, la fracción obtenida se filtró a través de un filtro de fluoruro de polivinildieno (PVDF) (0,45  $\mu$ ; F2604-5, SYMTA) y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se empleó un equipo cromatográfico Thermo (Thermo Electro Corporation) equipado con una bomba Spectra System P4000, un inyector automático AS3000 y un detector de fotodiodos alineados UV6000LP. Las muestras se inyectaron por duplicado en un cartucho modelo Nova-Pack C<sub>18</sub><sup>TM</sup> (25 cm x 4,0 mm d.i.; x 4,6  $\mu$ m de tamaño de partícula) en fase inversa con un gradiente de fase A (agua : ácido acético, 98:2, v/v) y B (agua : acetonitrilo : ácido acético, 78:20:2, v/v/v). El programa de elución fue: 0-55 min, 80% B, 1,1 ml/min; 55-57 min, 90% B isocrático, 1,2 ml/min; 70-80 min, 95% B lineal, 1,2 ml/min; 80-90 min, 100% B lineal, 1,2 ml/min; 100-120 min lavado con metanol 100%, 1 ml/min. La detección de los compuestos fenólicos se realizó mediante un barrido entre 220 y 380 nm (Bartolomé *et al.*, 2000). La identificación de los sustratos y productos de la degradación se llevó a cabo mediante la



comparación de los tiempos de retención y de los espectros de absorción de cada pico con estándares comerciales.

### 3.9. ESTUDIOS *IN SILICO*

#### 3.9.1. PREDICCIÓN DE LA PRESENCIA DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS DE TRANSMEMBRANA O SECRETORAS

Para predecir la presencia de proteínas con dominios de transmembrana o secretoras se analizó tanto la predicción de la topología de las proteínas mediante el método “Topology Membrane HMM” (Hidden Markov Model), que se basa en los supuestos del modelo oculto de Markov, como la utilización de los datos descritos por Zhou *et al.* (2008) en la herramienta LocatedP DataBase para estimar la localización sub-celular de las mismas.

El programa TMHMM Server v. 2.0 se utilizó para predecir la existencia de motivos de transmembrana (TM). El Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBSA) de la Universidad Técnica de Dinamarca ofrece esta herramienta bioinformática con acceso libre a través del sitio en internet <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas que codifican cada uno de los genes expresados diferencialmente, se copiaron en formato FASTA de la base de datos de la red de servicio del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI) (*L. plantarum* WCFS1 Acc. Nr. AL935263) para su análisis de forma similar a lo realizado con la herramienta ClustalW2.

La base de datos LocateP también tiene un acceso libre en la dirección <http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>. De igual forma se localizaron cada uno de los genes cuyo nivel de expresión se modificó y se anotó la categoría sub-celular predicha para cada proteína. En esta base de datos las posibles categorías son: i) anclada por el extremo N-terminal con sitio de escisión (“N-terminally anchored, with CS”); ii) anclada por el extremo N-terminal sin sitio de escisión (“N-terminally anchored, no CS”); iii) multi-transmembrana (“Multi-trans-membrane”); iv) secretada con sitio de escisión (“Secretory released, with CS”); v) secretada sin sitio de escisión (“Secretory released, no CS”); vi) intracelular (“Intracellular/TMH start after 60° C”); y vii) anclada a lípidos (“Lipid anchored”).

Al comparar la predicción obtenida según el modelo TMHMM y el predictor de localización subcelular LocateP se corroboró que ésta última herramienta logra una mejor predicción (el TMHMM excluyó a *lp\_0618* y *lp\_0991* como genes que codifican proteínas con dominios de transmembrana mientras que incluyó a *lp\_1390*), además de proporcionar

información adicional como lo es el tipo de ruta secretora (I o II), la forma de anclaje a la membrana o pared, la presencia de varios dominios transmembrana, la transición intracelular-extracelular, la presencia de péptido señal y los posibles sitios de escisión (“cleavage site”).

### **3.9.2. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE REDES DE REGULACIÓN Y POSIBLES SITIOS DE UNIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (OPERADORES O “BINDING SITES”)**

Muchos de los genes de *L. plantarum* WCFS1 involucrados en la respuesta al estrés producido por el ácido *p*-cumárico aparecen agrupados en “clusters” u operones. Se ha descrito que gran parte de éstos grupos de genes forman regulones en donde uno o varios operones se regulan por una proteína común o factor de transcripción, vía activación o represión en “tándem”.

Los posibles regulones afectados por la presencia del ácido fenólico se identificaron a partir de la información contenida en la base de datos RegPrecise/Collection of Manually Curated Inferences of Regulons in Prokaryotic Genomes v. 2.1 (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/help.jsp#what>). Los 250-300 pb “upstream” anteriores al codón de iniciación de cada gen se copiaron de la base PRODORIC Release 8.9 (<http://prodoric.tu-bs.de/index.php>) y sus secuencias se alinearon con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). Seguidamente las secuencias consenso o “motivos” se localizaron teniendo en cuenta los logotipos (LOGO) descritos como sitios de unión (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/help.jsp#what> y Groot Kormelink *et al.*, 2012). En los casos que fue necesario, se redefinió una nueva secuencia y se incluyeron en cada regulón los genes que presentaron el motivo o posible sitio de unión para cada factor de transcripción.

Paralelamente los motivos o secuencias consenso se confirmaron utilizando otra herramienta adicional denominada Virtual Footprint v. 3.0 que forma parte de la base PRODORIC ([http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp\\_regulon.php](http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp_regulon.php)) y que permite el análisis de regulones reconociendo patrones simples o compuestos en la secuencia de ADN anterior al codón de iniciación de múltiples genes. Se analizaron diferentes posibles secuencias IUPAC las cuales variaron en su longitud y orientación sobre la hebra de ADN y se permitieron discrepancias entre la coincidencia de los pares de base de la secuencia del gen y la secuencia del motivo (“Mismatches” = 1,2,3 o 4). El resto de los parámetros se usaron según la configuración predeterminada por el paquete bioinformático (Münch *et al.*, 2003; Münch *et al.*, 2005).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



La interacción entre los compuestos fenólicos y diversas especies de bacterias lácticas presentes de forma natural en fermentaciones vegetales, así como también en el tracto gastrointestinal, ha quedado plasmada en la exposición de antecedentes expuestos en el capítulo I de esta memoria y en un contexto amplio las investigaciones incluyen estudios en i) la degradación y metabolismo de ácidos fenólicos, taninos y estilbenos (Cavin *et al.*, 1993; Poussier *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2008; de las Rivas *et al.*, 2009; Curiel *et al.*, 2010); ii) la evaluación de los efectos antimicrobianos sobre el crecimiento y composición de la membrana bacteriana (Ruíz-Barba *et al.*, 1990; Rozès y Peres, 1998; Campos *et al.*, 2003; Landete *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2009; García-Ruiz *et al.*, 2011); y iii) el conocimiento de la respuesta general de cada bacteria a la presencia de tales compuestos y el estrés celular que pueden generar (van de Guchte *et al.*, 2002; Rivas-Sendra *et al.*, 2011; Curiel *et al.*, 2011).

#### **4.1. EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GÁLICO Y *P*-CUMÁRICO EN EL CRECIMIENTO DE *L. PLANTARUM***

Los compuestos fenólicos causan en general una inhibición en el crecimiento de diversas especies de bacterias que incluyen tanto aerobias como anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas. Los estudios realizados en bacterias ácido lácticas indican que cierto grupo de ácidos fenólicos pueden afectar de forma negativa al desarrollo de varias especies, mientras que otros ácidos no ocasionan alteraciones o incluso pueden estimular su crecimiento (Reguant *et al.*, 2000).

La actividad antimicrobiana de los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos está determinada por su estructura química, la cantidad y posición en la cual se presentan los grupos funcionales substitutos en el anillo aromático y la longitud de la cadena de carbonos saturada (Cueva *et al.*, 2010). Los ácidos fenólicos presentan en general, una menor actividad al comparar con sus ésteres de metilo y butilo; y el efecto antimicrobiano se incrementa a medida que aumenta la longitud de la cadena de alquilo (Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011).

#### 4.1.1. CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS EN LAS CONDICIONES ESPECÍFICAS DEL ESTUDIO

Una forma de evaluar y comparar el efecto causado por una sustancia en varias especies o de varias sustancias en una misma especie es determinar la concentración a la cual se observa una inhibición total del crecimiento poblacional o concentración mínima inhibitoria (MIC). Ciertos ácidos fenólicos como el gálico, salicílico, y sus ésteres como el galato de metilo, entre otros, parecen no influir en el crecimiento de algunas especies de *L. plantarum* (en RPM modificado) y *O. oeni* (en medio basal modificado) (Reguant *et al.*, 2000; Landete *et al.*, 2007; García-Ruiz *et al.*, 2009). Sin embargo, el efecto antimicrobiano de los ácidos cinámicos como el cafeico, ferúlico y *p*-cumárico parece ser más pronunciado. Muchas veces estos resultados no pueden extrapolarse a otros estudios debido principalmente a las variaciones en la composición del medio de cultivo utilizado y a la biodiversidad de la cepa. Investigaciones que contemplan el ambiente gastrointestinal donde estas bacterias habitan o fracciones de residuos de la industria de alimentos y bebidas, son mucho más complejas ya que los efectos observados muchas veces son producto de sinergias entre varios factores.

En este estudio se determinó la MIC de los compuestos a los cuales se deseaba exponer las células de *L. plantarum* en el mismo medio de cultivo y en idénticas condiciones a las empleadas en los estudios de expresión génica o transcriptómica. Se seleccionó el medio MRS, en lugar de un medio mínimo basal como el RPM, por ser un medio nutritivo, no restrictivo, que garantiza la mínima perturbación a la población celular, con lo cual las variaciones observadas entre el grupo control y el grupo de prueba en presencia del compuesto se pudieron adjudicar al compuesto añadido.

La cepa de *L. plantarum* WCFS1 usada en este estudio se aisló del tracto digestivo de humanos por lo que su exposición a los compuestos fenólicos presentes en la dieta puede condicionar su metabolismo. El efecto antimicrobiano del ácido gálico en el medio MRS fue equivalente a lo observado en los estudios de Landete *et al.* (2007) utilizando el medio RPM (Tabla VII) lo que indica que una restricción en la disponibilidad del carbono o nitrógeno, así como también de la fuente que aporta éstos elementos esenciales, no condiciona el efecto antimicrobiano de este compuesto fenólico, al menos al comparar los valores determinados en un medio complejo como el MRS y en un medio mínimo definido como el RPM.

**Tabla VII.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) del ácido gálico (A) y ácido *p*-cumárico (B). A cultivos de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en medio MRS líquido (10 mL) se les añadió el compuesto fenólico y se incubó a 30 °C durante 48 horas sin agitación. Las lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas.

| Experimento                            | Concentración final del compuesto |                |       |       |       |       |       |        |
|--|-----------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|  | A) ácido gálico (mM)              |                |       |       |       |       |       |        |
|  | 100                               | 50             | 25    | 12,5  | 6,25  | 3,125 | 1,563 | 0,781  |
| 1                                      | ++++                              | ++++           | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| 2                                      | ++++                              | ++++           | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| 3                                      | ++++                              | ++++           | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| Control (+) <sup>c</sup>               | ++++                              | ++++           | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| Control (-) <sup>d,e</sup>             | - <sup>a</sup>                    | -              | -     | -     | -     | -     | -     | -      |
|  | B) ácido <i>p</i> -cumárico (mM)  |                |       |       |       |       |       |        |
|  | 40                                | 20             | 10    | 5     | 2,5   | 1,25  | 0,625 | 0,3125 |
| 1                                      | - <sup>a</sup>                    | + <sup>b</sup> | ++    | +++   | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| 2                                      | -                                 | -              | ++    | +++   | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| 3                                      | -                                 | +              | ++    | +++   | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| Control (+) <sup>c</sup>               | ++++                              | ++++           | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++++   |
| Control (-) <sup>d</sup>               | -                                 | -              | -     | -     | -     | -     | -     | -      |
| Concentración de EtOH (%) <sup>f</sup> | 5,5                               | 2,75           | 1,375 | 0,687 | 0,344 | 0,172 | 0,086 | 0,043  |

<sup>a</sup> sin crecimiento -, turbidez es equivalente al control negativo

<sup>b</sup> crecimiento +, turbidez superior al control negativo, el número de + es proporcional a la turbidez

<sup>c</sup> control positivo: medio MRS + inóculo *L. plantarum* WCFS1 al 1%, sin adición del compuesto

<sup>d</sup> control negativo: medio MRS, sin inóculo, con adición del compuesto a la concentración indicada

<sup>e</sup>: la solución “madre” del ácido gálico fue preparada a 200 mM y se empleó medio MRS para su disolución.

<sup>f</sup>: la solución “madre” del ácido *p*-cumárico fue preparada a 400 mM y se empleó etanol (55% v/v) en medio MRS para lograr su disolución. *L. plantarum* WCFS1 crece bien a concentraciones de hasta 6-7% etanol.

No se detectó inhibición del crecimiento en ninguno de los tubos en presencia de ácido gálico (MIC>100 mM; 19g/L) (Tabla VII.A), así como tampoco una disminución en la biomasa con respecto al tubo control (sin adición del compuesto). Mediante microscopía de contraste de fase no se observó ningún cambio en la morfología celular (tamaño, borde, forma), ni presencia de células rotas o restos de paredes y de membranas. De igual forma, la cantidad de biomasa a las 24 horas de incubación en presencia de 200 mM de ácido gálico fue equivalente a la del cultivo control (datos no presentados). Se ha descrito que la presencia de este ácido fenólico, en concentraciones equivalentes a la que normalmente se presentan en vinos, estimula la tasa de crecimiento en algunas cepas de *L. hilgardii* y promueve una densidad celular mayor durante la fase estacionaria, sugiriéndose que este comportamiento es el resultado de una velocidad mayor de utilización de glucosa y fructosa (Alberto *et al.*, 2001).

Los ácidos *p*-cumárico, cafeico o ferúlico son más tóxicos para la mayoría de las BAL tal y como lo reflejan las MIC determinadas en diversos estudios (Landete *et al.*, 2007; Landete *et al.*, 2008; Rivas-Sendra *et al.*, 2011). Rozès y Peres (1998) determinaron por una parte que el crecimiento de la cepa *L. plantarum* DSM 10492 se inhibe a medida que las concentraciones de ácido cafeico aumentan de 0,5 mM hasta 5 mM sin observarse un retraso en el inicio del crecimiento, mientras que en presencia de ácido ferúlico, el efecto inhibitorio es bajo aún a concentraciones de 5 mM.

Se ha descrito que la MIC del ácido *p*-cumárico para *L. casei* BL23 y *L. plantarum* es similar para ambas especies y alcanza valores de 25-50 mM (Landete *et al.*, 2007; Rivas-Sendra *et al.*, 2011). Landete *et al.* (2008) describieron que la inhibición del crecimiento de tres cepas de *L. plantarum* en presencia del ácido *p*-cumárico ocurre a concentraciones entre 12,5 y 25mM en medio RPM. Estos valores son equivalentes a los observados en este estudio para *L. plantarum* WCFS1 en el medio MRS (MIC>15-20 mM) (Tabla VII.B). Se ha descrito que la adición al medio de cultivo de ácido *p*-cumárico a concentración de 0,6 a 3 mM no tiene un efecto aparente en el crecimiento de la cepa *L. plantarum* LPNC8, aunque a concentraciones superiores a 6 mM se observa un incremento en el periodo de la fase de latencia (Barthelmebs *et al.*, 2000a). Datos adicionales permiten establecer que a concentraciones superiores a 5 mM, una bajada en el pH del medio (de 6,5 a 4,5) se traduce en un incremento en su toxicidad con una disminución de la velocidad de multiplicación celular. Se ha postulado que a medida que el ácido fenólico se metaboliza a compuestos menos tóxicos, la población celular recupera su tasa de crecimiento (Barthelmebs *et al.*, 2000a).

Los mecanismos de respuesta de *L. plantarum* frente a la presencia de una sustancia que exhibe alta toxicidad como el ácido *p*-cumárico posiblemente sean más complejos que aquellos que se desencadenan frente al ácido gálico e hipotéticamente podrían involucrar genes diferentes según el estrés celular que es producido. Las variaciones en el patrón de respuesta se reflejan en los niveles de la expresión génica y se pueden conocer a través de la cuantificación exacta de todos los ARN mensajeros expresados en un momento dado y bajo unas condiciones establecidas.

Las diferencias observadas entre el efecto que ejerce la presencia del ácido gálico y del ácido *p*-cumárico en el crecimiento de esta especie motivó la realización un estudio comparativo mediante análisis de micromatrices de ADNc con el fin de evaluar de forma global el perfil transcriptómico en la cepa WCFS1 e inferir los posibles mecanismos que se activan cuando en el



medio de cultivo están presentes concentraciones sub-letales de las sustancias de interés. Se realizó un primer análisis utilizando una concentración de 1,5 mM de ácido gálico y posteriormente, en función los resultados de este ensayo, se estableció utilizar una concentración entre 10 y 20 veces inferior a las MIC determinadas en este estudio. Así, los dos siguientes estudios transcriptómicos se realizaron en presencia de 15 mM de ácido gálico y de 1,5 mM de ácido *p*-cumárico.

## 4.2. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

Esta sección persigue identificar los mecanismos involucrados en la tolerancia y adaptación de *L. plantarum* WCFS1 a los ácidos gálico y *p*-cumárico a través del estudio de los genes cuyo nivel de expresión se modifica. Para ello, el perfil transcriptómico de esta cepa se evaluó mediante matrices de ADN hibridizadas con ADNc sintetizado a partir del ARN de las células en fase de crecimiento exponencial después de 10 minutos de exposición a los ácidos fenólicos citados.

Los datos obtenidos del análisis de la micromatriz discutidos en este estudio se han depositado en la base de datos “Gene Expression Omnibus” del NCBI (Edgar *et al.*, 2002) y se puede acceder a ellos través del número de serie GEO GSE40126 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE40126>). El análisis de los datos consideró aquellos genes cuyo nivel de transcripción mostró cambios de al menos  $\pm 1,5$  (FDR<0,05 y  $p < 0,05$ ). Una vez obtenidos los resultados, se realizaron los cálculos de promedio y desviación estándar de los replicados de cada gen y se procedió a validarlos mediante el análisis de la expresión génica por RT-qPCR. La validación incluyó genes cuyos niveles de expresión aumentaron (inducción) o disminuyeron (represión), así como también genes cuya expresión no varió con respecto al control (genes con expresión constitutiva o genes que no responden al estímulo). Se seleccionaron seis u ocho genes y se verificaron por RT-qPCR empleando ADNc sintetizado a partir de las mismas muestras de ARN utilizadas en los ensayos con las micromatrices.

En las tablas VIII y IX se muestran los resultados de la validación por RT-qPCR del análisis de micromatrices correspondientes a la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 frente a la presencia de ácido gálico 15 mM y ácido *p*-cumárico 1,5 mM, respectivamente. La validación de

la respuesta en presencia de ácido gálico 1,5 mM presentó resultados equivalentes (datos no presentados).

**Tabla VIII.** Validación por RT-qPCR de los resultados del análisis de micromatrices de ADN correspondientes a la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido gálico 15 mM. El estudio de correlación lineal entre ambos métodos presentó una ecuación lineal  $y = 0,973x + 0,107$  y un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0,97$ .

| Gen ID                                 | Locus         | Descripción   | Cambio en la expresión <sup>a, b</sup> |                      |
|--|---------------|---|--|----------------------|
|  |               |   | Micromatriz <sup>c</sup>               | RT-qPCR <sup>d</sup> |
| <b>Genes con inducción:</b>            |               |   |  |                      |
| <i>lp_2945</i>                         | <i>lpdC</i>   | descarboxilasa de ácidos aromáticos, subunidad C                                  | 8,09                                   | 8,58                 |
| <i>lp_0271</i>                         | <i>lpdB</i>   | descarboxilasa de ácidos aromáticos, subunidad B                                  | 4,72                                   | 4,33                 |
| <i>lp_2940</i>                         |               | precursor de proteína de superficie celular, anclada por el motivo LPXTG de pared | 3,84                                   | 4,38                 |
| <i>lp_2956</i>                         | <i>lpTan1</i> | tanasa (tanino acil hidrolasa)  | 3,37                                   | 2,22                 |
| <i>lp_1424</i>                         | -             | proteína familia de las FMN reductasas dependientes de NADPH                      | 1,78                                   | 1,64                 |
| <b>Genes con represión:</b>            |               |   |  |                      |
| <i>lp_0349</i>                         | <i>amtB</i>   | proteína de transporte de amonio  | -2,81                                  | -2,84                |
| <b>Genes sin cambio significativo:</b> |               |   |  |                      |
| <i>lp_0129</i>                         | <i>hsp1</i>   | proteína de choque térmico “small heat shock”                                     | 0,35                                   | 0,19                 |
| <i>lp_0789</i>                         | <i>gapB</i>   | gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa   | -0,28                                  | -0,27                |
| <i>lp_1036</i>                         | <i>rplB</i>   | L2 proteína 50S ribosómica  | -1,02                                  | -0,67                |
| <i>lp_2799</i>                         |               | proteína de transporte de aminoácidos   | -0,21                                  | -0,17                |
| <b>Gen control (endógeno):</b>         |               |   |  |                      |
| <i>lp_2057</i>                         | <i>ldhD</i>   | D-lactato deshidrogenasa  | -1,15                                  | 0,01                 |

<sup>a</sup> Variaciones “ratios” cuyo cambio fue >1,5 veces (tanto en incremento o disminución) se consideró que se alteraron significativamente ( $p < 0,05$ ); excepto para los genes sin cambio

<sup>b</sup> Valores cercanos al cero indican que no ocurrieron cambios con respecto a los genes de referencia o “housekeeping” (*ldhD*, *16SARNr*, *gyrA*, *dnaG*)

<sup>c</sup>  $\log_2(\text{ratio}(M))$ , donde  $\text{ratio}(M)$  = magnitud del cambio en número de veces

<sup>d</sup> promedio de los  $\log_2$  (magnitud del cambio en número de veces): (“ $\log_2$  ratios fold change”)

**Tabla IX.** Validación por RT-qPCR de los resultados del análisis de micromatrices de ADNc correspondientes a la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. El estudio de correlación lineal entre ambos métodos presentó una ecuación lineal  $y = 1,087x + 0,118$  y un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0,97$ .

| Gen ID                           | Locus       | Descripción   | Cambio en la expresión <sup>a, b</sup> |                      |
|----------------------------------|-------------|---|--|----------------------|
|                                  |             |   | Micromatriz <sup>c</sup>               | RT-qPCR <sup>d</sup> |
| <b>Genes con inducción:</b>      |             |   |  |                      |
| <i>lp_3665</i>                   | <i>pdC</i>  | descarboxilasa del ácido <i>p</i> -cumárico         | 6,81                                   | 8,36                 |
|                                  | <i>oppA</i> | transportador ABC de oligopéptidos,                 |  |                      |
| <i>lp_1261</i>                   |             | proteína de unión al sustrato                       | 4,42                                   | 4,26                 |
| <i>lp_0129</i>                   | <i>hsp1</i> | proteína de choque térmico “small heat shock”       | 3,39                                   | 4,02                 |
| <i>lp_3664</i>                   | <i>padR</i> | regulador del metabolismo de ácidos fenólicos, PadR | 1,95                                   | 1,17                 |
| <i>lp_3663</i>                   | -           | proteína hipotética <i>lp_3663</i>                  | 1,07                                   | 1,11                 |
| <b>Genes con represión:</b>      |             |   |  |                      |
| <i>lp_2799</i>                   | -           | proteína de transporte de aminoácidos               | -2,45                                  | -2,95                |
| <i>lp_0349</i>                   | <i>amtB</i> | proteína de transporte de amonio                    | -2,17                                  | -1,95                |
| <i>lp_1036</i>                   | <i>rplB</i> | L2 proteína 50S ribosómica                          | -2,12                                  | -1,42                |
| <b>Genes control (endógeno):</b> |             |   |  |                      |
| <i>lp_2057</i>                   | <i>ldhD</i> | D-lactato deshidrogenasa                            | -0,25                                  | 0,05                 |

<sup>a</sup> Variaciones o “ratios” cuyo cambio fue >1,5 veces (tanto en incremento o disminución) se consideró que se alteraron significativamente ( $p < 0,05$ )

<sup>b</sup> Valores cercanos al cero indican que no ocurrieron cambios con respecto a los genes de referencia o “housekeeping” (*ldhD*, *16SARNr*, *gyrA*, *dnaG*)

<sup>c</sup>  $\log_2(\text{ratio}(M))$ , donde  $\text{ratio}(M)$  = magnitud del cambio en número de veces

<sup>d</sup> promedio de los  $\log_2$  (magnitud del cambio en número de veces): (“ $\log_2$  ratios fold change”)

Los valores obtenidos del análisis de micromatrices se transforman calculando el logaritmo en base 2 del cambio observado en número de veces ( $\log_2$  de la variación de M). El análisis por RT-qPCR indica la expresión relativa de los genes con respecto al grupo control. En este análisis se empleó como gen endógeno control *lp\_2057* (*ldhD*) que codifica la enzima D-lactato deshidrogenasa. Los genes comparados para el ácido gálico fueron *lp\_0129*, *lp\_0271* (*lpdB*), *lp\_0349*, *lp\_0789* (*gapB*), *lp\_1036*, *lp\_1424*, *lp\_2799*, *lp\_2940*, *lp\_2945* (*lpdC*) y *lp\_2956* (*lptan1*). Los genes comparados para el ácido *p*-cumárico fueron *lp\_0129*, *lp\_0349*, *lp\_1036*, *lp\_1261*, *lp\_2799*, *lp\_3663*, *lp\_3664* (*padR*) y *lp\_3665* (*pdC*).

En general, los valores del cambio observado ( $\log_2$  de la variación M) obtenidos por ambos métodos son equivalentes y muestran la misma tendencia en cuanto a la dirección en la cual el cambio ocurre (inducción o represión). Cabe señalar que los valores absolutos del cambio

en números de veces no son exactos y las pequeñas variaciones observadas se pueden atribuir a las diferencias técnicas en los métodos de análisis y normalización (Kim *et al.*, 2006; Hüfner, *et al.*, 2009; Allen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

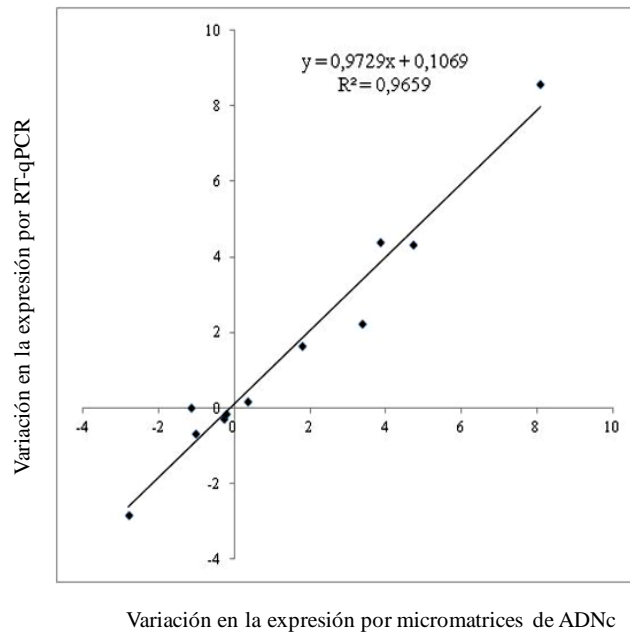
El análisis estadístico se realizó a través de un estudio de correlación y los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) del ajuste de regresión lineal aplicado a los datos fueron de 0,97 en ambos casos (Figura 16). Estos resultados evidencian que los genes evaluados se expresan en cada una de las dos condiciones analizadas y validan el patrón de hibridación de las micromatrices de ADNc. Una vez validados los datos se pasó al análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

De manera general, el número de genes expresados diferencialmente en el análisis de micromatrices cuando *L. plantarum* WCFS1 se cultiva en presencia de ácido gálico o de ácido *p*-cumárico refleja la complejidad de la respuesta y el nivel de toxicidad de cada compuesto.

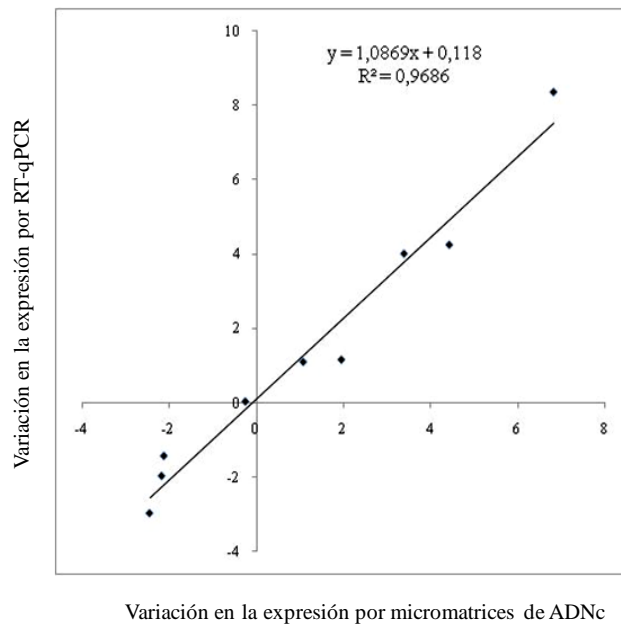
La figura 17 muestra la distribución gráfica espacial de los genes que variaron significativamente su nivel de transcripción en las diferentes concentraciones evaluadas. Los genes que mostraron una inducción en sus niveles de expresión se presentan en rojo, los que no variaron en gris y los que experimentaron represión en verde. En el lado derecho se observan los “heat maps” que resumen los niveles de expresión de cada micromatriz (FIESTA Viewer v.1.0; Oliveros, J.C., 2007). Se puede observar que la nube de puntos correspondientes a los genes inducidos y reprimidos durante la exposición de las células al ácido *p*-cumárico 1,5 mM es más numerosa que la observada a 1,5 y 15 mM de ácido gálico. La variación en el nivel de transcripción de los genes involucrados en las reacciones principales de degradación de estos compuestos, como lo son los genes *lp\_2945* (*lpdC*) *lp\_0271* (*lpdB*) y *lp\_0272* (*lpdD*), implicados en la descarboxilación del ácido gálico por una parte y, del gen *lp\_3665* (*pdC*), que participa en la descarboxilación del ácido *p*-cumárico por la otra, son equivalentes y cercanas a 7-8 en número de veces superiores al logaritmo en base 2 del cambio observado en el grupo control (log ratio M).

Este perfil refleja el carácter específico y pronunciado de la principal respuesta que ocurre frente a ambos compuestos. En cuanto a la respuesta general, es en presencia del ácido *p*-cumárico donde se visualiza una respuesta global que ocasiona una variación “fina” en el nivel de transcripción de numerosos genes, con cambios que van desde 1,5 a 2 veces tanto en inducción como represión.

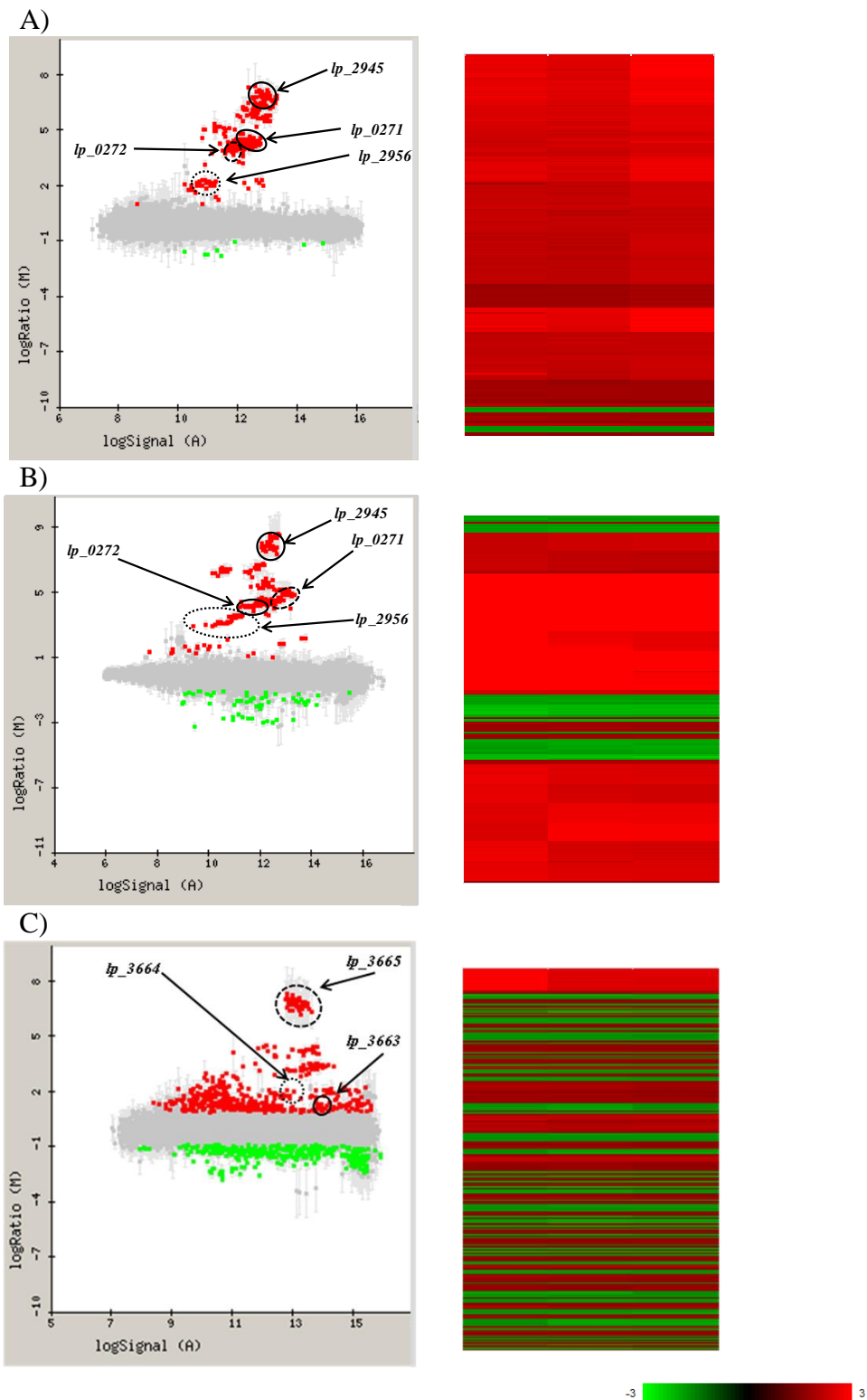
A)



B)



**Figura 16.** Equivalencia entre los resultados del análisis de micromatrices de ADNc y del ensayo de RT-qPCR mediante un estudio de correlación que emplea un ajuste de regresión lineal. Los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) entre ambos métodos son elevados (0,97). Ácido gálico 15 mM (A); ácido *p*-cumárico 1,5 mM (B).



**Figura 17.** Distribución espacial de los genes expresados diferencialmente en el análisis de micromatrices en presencia de ácido gálico 1,5 mM (A) y 15 mM (B), y de ácido *p*-cumárico 1,5 mM (C). La magnitud del cambio (FC) (logRatioM) se grafica en función de la intensidad de la señal (logSignalA). Se señalan los puntos de los principales genes relacionados con la respuesta específica de descarboxilación de estas sustancias fenólicas. A la derecha se tiene el “heat map”. Rojo:inducción; Verde:represión.

El número de genes que se expresan diferencialmente en respuesta a la presencia del ácido gálico a 1,5 y 15 mM se aprecian en la tabla X. A una concentración de 1,5 mM se altera la expresión del 0,5% de los genes de *L. plantarum* WCFS1. Un aumento en la concentración del ácido gálico (a valores cercanos a 10 veces menos la MIC calculada) ocasiona un incremento en el porcentaje del total los genes afectados (1,3%), sin embargo, la respuesta continúa siendo limitada a pesar de observarse una incipiente alteración de los niveles de transcripción de algunos grupos de genes que, como se expondrá más adelante en detalle, tienen relación con ciertos mecanismos de defensa.

**Tabla X.** Número de genes de *L. plantarum* WCFS1 expresados diferencialmente en el análisis de micromatrices de ADNc en respuesta a la presencia del ácido gálico (hidroxibenzoico) o *p*-cumárico (derivado hidroxicinámico) en concentraciones sub-letales.

| Compuesto fenólico       | Concentración (mM) | Número de genes |            | Total genes alterados | Porcentaje del total de genes <sup>a</sup> (%) |
|--------------------------|--------------------|-----------------|------------|-----------------------|--|
|                          |                    | Inducidos       | Reprimidos |                       |  |
| Acido gálico             | 1,50               | 10              | 4          | 14                    | <b>0,5</b>                                     |
| Acido gálico             | 15,0               | 15              | 25         | 40                    | <b>1,3</b>                                     |
| Acido <i>p</i> -cumárico | 1,50               | 144             | 136        | 280                   | <b>9,1</b>                                     |

<sup>a</sup> Un total de 3066 genes representados en la micromatriz

Por otra parte, la respuesta frente al ácido *p*-cumárico es amplia y presenta una cantidad mayor de genes alterados, con un total de 280 genes afectados significativamente, que representan cerca del 9% de los genes de *L. plantarum* WCFS1. Dicha respuesta, que se analizará más adelante, a primera vista parece incluir múltiples rutas metabólicas (los genes que participan en la descarboxilación de este ácido hidroxicinámico, así como también otros genes relacionados a estrés general y oxidativo, entre otros); que parecen alterarse de forma coordinada con la finalidad de superar los efectos dañinos que ocasiona este compuesto, y que al juzgar por el número de genes que modifican sus niveles de expresión, parecen ser muy agresivos.

## 4.2.1. RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA DE *L. PLANTARUM* WCFS1 EN PRESENCIA DE ÁCIDO GÁLICO

### 4.2.1.1. VISIÓN GENERAL

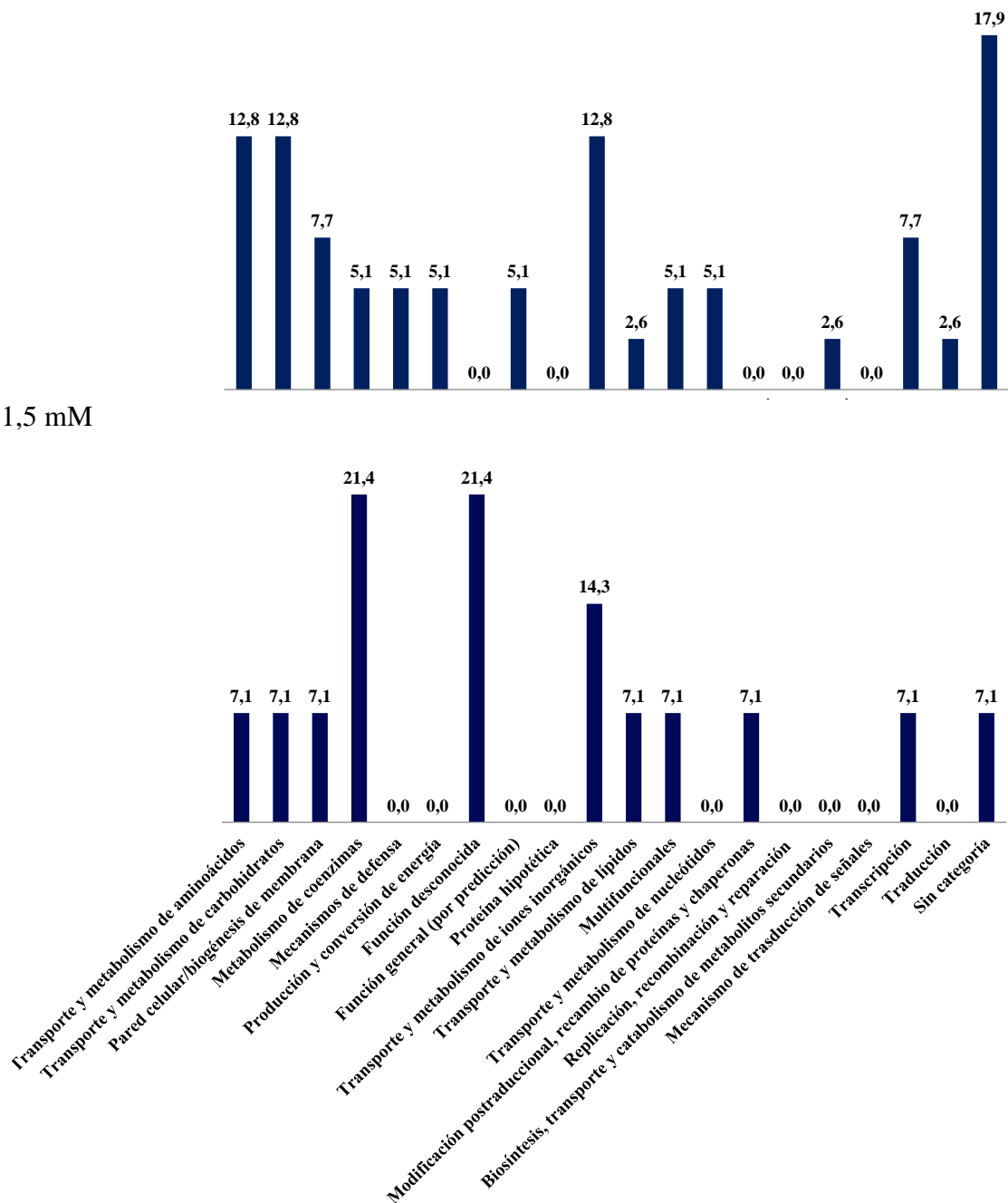
Una visión de la respuesta transcriptómica a la presencia del ácido gálico evidencia el bajo número de genes que a una concentración de 15 mM mostraron una expresión diferencial con cambios de al menos  $\pm 1,5$  veces con respecto al grupo control sin adición del compuesto (FDR<0,05 y p <0,05). De 3066 genes representados en la micromatriz, en 15 se observó una inducción en sus niveles de transcripción y en 25 una represión, lo que representa un total de 40 genes afectados. Si se comparan estos valores con los resultados a 1,5 mM se tiene un menor número de genes: 10, 4 y 14, respectivamente. Los genes regulados diferencialmente se asociaron a las categorías funcionales CGO (“Clusters of Orthologous Groups”; Tatusov *et al.*, 2003) descritas en su mayoría por Kleerebezem *et al.* (2003). Los genes cuya expresión se alteró en presencia de ácido gálico 1,5 mM se agrupan en 9 categorías funcionales. Al aumentar la concentración del compuesto se involucran en la respuesta genes pertenecientes a otras categorías funcionales que incluyen: i) mecanismos de defensa, ii) producción y conversión de energía, iii) transporte y catabolismo de metabolitos secundarios, iv) transporte y metabolismo de nucleótidos y v) traducción (Figura 18). La aparición de genes relacionados con mecanismos de defensa cuando las células del cultivo se exponen al ácido fenólico a una concentración de 15 mM puede indicar que la maquinaria celular responde a la señal de estrés que se deriva de la disminución en el pH del medio circundante, del desequilibrio electrolítico y del ambiente oxidativo que se desencadena. Las categorías funcionales con el mayor número de genes presentando una represión en sus niveles de expresión son transporte y catabolismo de carbohidratos, transporte y metabolismo de iones inorgánicos y pared celular y biogénesis de membrana (Figura 19).

A 15 mM los niveles más altos de inducción observados fueron de 272 veces para el gen *lp\_2945* (*lpdC*), que como ya se expuso codifica una de las subunidades de la enzima galato descarboxilasa (Curiel, 2010; Jiménez *et al.*, 2013); y de 73 veces para el gen *lp\_2943*, que codifica una posible proteína transportadora de cationes. Por otra parte, los niveles más elevados de represión fueron de 7,3 veces para el gen *lp\_2739*, que hipotéticamente es el responsable de la síntesis de la subunidad que se une al ATP de un transportador tipo ABC; y de 7 veces para el gen *lp\_0349*, responsable de la síntesis de una proteína involucrada en el transporte de amonio.

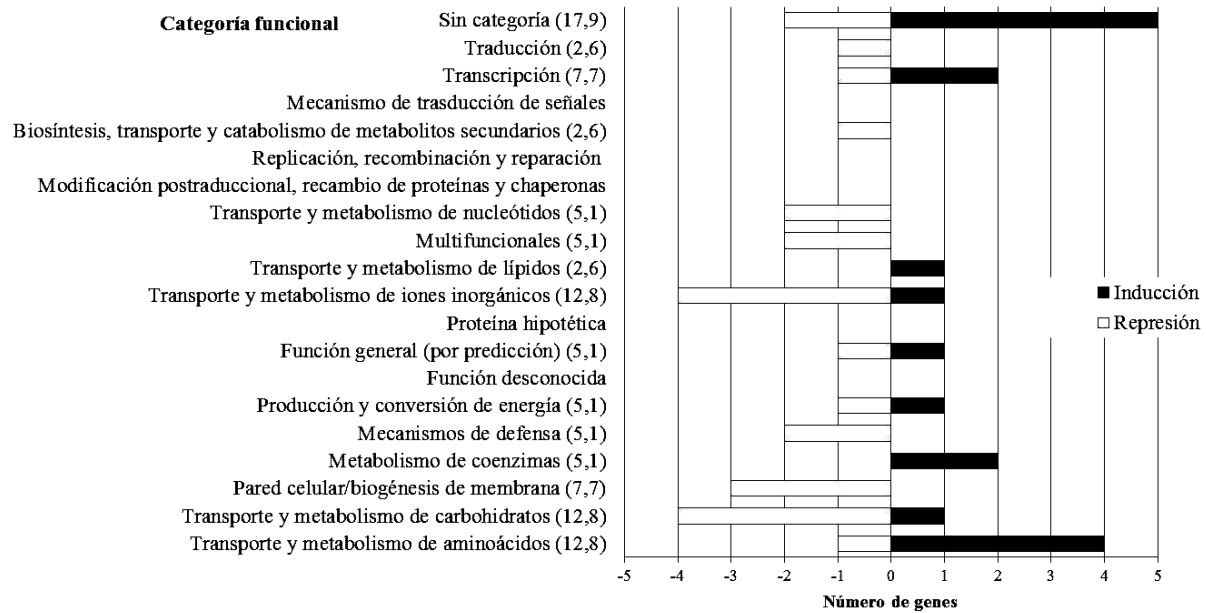


15mM

1,5 mM



**Figura 18.** Porcentaje de genes de *L. plantarum* WCFS1 que alteraron sus niveles de expresión significativamente ( $FC > 1,5$ ;  $p < 0,05$ ;  $FDR < 0,05$ ) en presencia de ácido gálico 1,5 y 15 mM agrupados por categorías funcionales CGO (“Clusters of Orthologous Groups”). El porcentaje es referido al total de genes en cada caso (14 genes a 1,5 mM y 40 genes a 15 mM).



**Figura 19.** Expresión génica por categorías funcionales en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido gálico 15 mM. Referido al número de genes cuya expresión se induce o reprime más de 1,5 veces con respecto al control. En paréntesis se detalla el porcentaje de genes diferencialmente expresados por cada categoría (FC>1,5; p<0,05; FDR<0,05).

En la tabla XI se presentan los genes expresados diferencialmente, ordenados de mayor a menor inducción y de menor a mayor represión, en función de la variación en el nivel de transcripción e indicando la presencia de posibles unidades transcripcionales u operones (señalados con un recuadro del mismo color). De esta forma se identificaron 2 posibles operones dentro del grupo de genes con una marcada inducción (desde *lp\_2945* a *lp\_2940* y desde *lp\_0271* a *lp\_0274*) y uno dentro del grupo de genes con el nivel de represión más elevado (desde *lp\_2739* hasta *lp\_2744*). La inducción de los genes *lp\_2954* y *lp\_2956* se relacionó con el posible operón que abarca desde *lp\_2945* a *lp\_2940*.

No se observaron cambios en ninguno de los genes que normalmente participan en los procesos relacionados con la adaptación al estrés como los genes clase I (chaperonas moleculares) y clase III (proteasas dependientes de ATP), así como tampoco los de las proteínas de choque térmico. Sin embargo, más de la mitad de los genes que presentaron una disminución en el nivel de expresión, tanto a una concentración de 1,5 mM como a 15 mM (en este último caso mucho más marcado), se relacionan con proteínas de membrana y transportadores que podrían afectarse por los cambios en los potenciales de membrana o por el gasto energético celular asociados a la presencia del ácido gálico.

**Tabla XI.** Genes expresados diferencialmente en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en presencia de ácido gálico 1,5 mM y 15 mM. Posibles genes de un mismo operón se señalan con igual color.

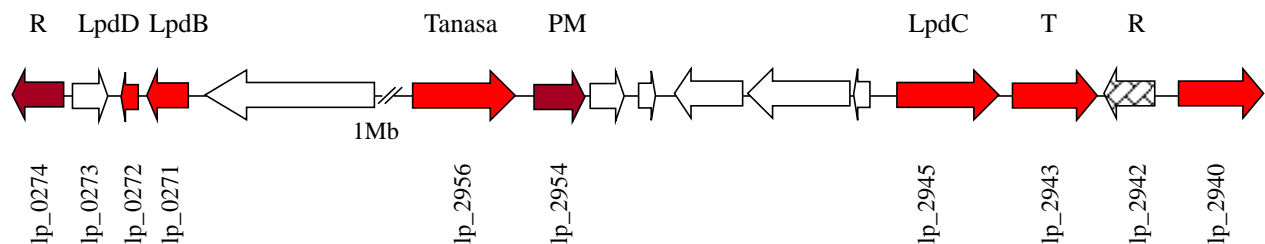
| Gen ID  | Locus           | Descripción   | Magnitud del Cambio <sup>a,b</sup> |                    |
|---|-----------------|---|------------------------------------|--------------------|
|   |                 |   | 1,5 mM                             | 15 mM              |
| lp_2945   | lpdC            | descarboxilasa de ácidos aromáticos, subunidad C                              | 108,47                             | 272,09             |
| lp_2943   | -               | proteína transportadora de cationes   | 51,95                              | 73,41              |
| lp_0271   | lpdB            | descarboxilasa de ácidos aromáticos, subunidad B                              | 19,61                              | 26,30              |
| lp_0272   | lpdD            | descarboxilasa de ácidos aromáticos, subunidad D                              | 18,84                              | 23,98              |
| lp_2940   | -               | precursor de proteína de superficie celular, anclada por el motivo LPXTG      | 10,09                              | 14,33              |
| lp_2956   | tanL            | tanasa (tanino acil hidrolasa)  | 4,24                               | 10,34              |
| lp_0274   | -               | regulador transcripcional de la familia TetR                                  | 4,43                               | 4,15               |
| lp_1424   | -               | proteína familia de las FMN reductasas dependientes de NADPH                  |                                    | 3,44               |
| lp_1425   | -               | fumarato reductasa, flavoproteína FAD/FMN reductasa dependiente de NADPH      |                                    | 3,11               |
| lp_2954   | -               | proteína de membrana hipotética   |                                    | 2,92               |
| lp_1948   | -               | regulador transcripcional de la familia MarR                                  |                                    | 2,90               |
| lp_1949   | -               | proteína de membrana hipotética   |                                    | 2,78               |
| lp_1590   | -               | proteína hipotética   |                                    | 2,70               |
| lp_3012   | -               | oxidoreductasa (putativa)   | 2,49                               |                    |
| lp_2312   | glnH2           | transportador ABC glutamina/histidina, proteína de unión al sustrato          |                                    | 2,34               |
| lp_0250   | -               | dihidroorotasa  | 2,06                               |                    |
| lp_2949   | -               | proteína integral de membrana   | 2,03                               |                    |
| lp_0226   | nagB            | glucosamina-6-fosfato isomerasa/desaminasa                                    |                                    | 2,03               |
| lp_2776   | dsdA            | deshidratasa D-serina   | -2,08                              |                    |
| lp_3660   | rbsK            | riboquinasa   |                                    | -2,08              |
| lp_1580   | glnR            | represor de glutamina sintetasa   |                                    | -2,10 <sup>c</sup> |
| lp_2830   | aspA            | aspartato amonio-liasa  |                                    | -2,12              |
| lp_0728   | groEL           | chaperonina GroEL   | -2,14                              |                    |
| lp_2744   | -               | transportador ABC, permeasa   |                                    | -2,14              |
| lp_0747   | pstD            | transportador ABC fosfato, permeasa   |                                    | -2,16              |
| lp_0748   | pstC            | transportador ABC fosfato, permeasa   |                                    | -2,16              |
| lp_1061   | rpsK            | S11 proteína 30S ribosomal  |                                    | -2,16              |
| lp_3659   | rbsD            | mutarotasa D-ribosa   |                                    | -2,18              |
| lp_0803   | glnQ1           | transportador ABC de glutamina, proteína de unión al ATP                      |                                    | -2,20              |
| lp_1682   | -               | fosfopanteteína transferasa   | -2,26                              |                    |
| lp_2659   | Xpk1            | xilulosa-5-P fosfocetolasa / fructosa-6-P fosfocetolasa                       |                                    | -2,35              |
| lp_2105   | galE3/<br>cps4D | UDP N-acetil glucosamina 4-epimerasa, NAD dependiente                         |                                    | -2,37              |
| lp_1581   | glnA            | ligasa glutamato-amonio / glutamine sintetasa                                 |                                    | -2,45              |
| lp_2741   | -               | proteína de membrana hipotética   |                                    | -2,62              |
| lp_2743   | -               | transportador ABC, proteína de unión al ATP                                   |                                    | -2,67              |
| lp_2363   | atpC            | ATP sintasa F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> , subunidad epsilon                 |                                    | -2,90              |
| lp_3270   | purA            | sintasa adenilosuccinato  |                                    | -2,96              |
| lp_3271   | guaC            | guanosina 5'-monofosfato oxidoreductasa (provisional)                         |                                    | -3,00              |
| lp_0802   | glnPH1          | transportador ABC de glutamina, proteína de unión al sustrato y permeasa      |                                    | -3,13              |
| lp_2742   | -               | regulador transcripcional de la familia GntR                                  |                                    | -3,37              |
| lp_3015   | -               | extracelular transglicosilasa, con dominio de unión a LysM del peptidoglicano |                                    | -3,43              |
| lp_0822   | glnS1           | transaminasa glutamina-fructosa-6-fosfato                                     |                                    | -3,47              |
| lp_2229   | -               | hidrolasa dependiente de metales, superfamilia III beta-lactamasa             |                                    | -4,13              |
| lp_2740   | -               | transportador ABC, permeasa   |                                    | -6,71              |
| lp_0349   | amtB            | proteína de transporte de amonio  | -3,14                              | -7,02              |
| lp_2739   | -               | transportador ABC, proteína de unión al ATP                                   |                                    | -7,25              |
| <b>Total de genes expresados diferencialmente</b> |                 |   | <b>14</b>                          | <b>40</b>          |

<sup>a</sup> Magnitud del cambio en número de veces en cultivos crecidos en medio MRS suplementado con ácido gálico a las concentraciones indicadas luego de 10 minutos de exposición en relación a cultivos sin suplementar

<sup>b</sup> Cambio >1,5 veces tanto en incremento (+) o disminución (-) fueron expresados diferencialmente con una FDR menor al 5% (p ≤ 0,05) o <sup>d</sup>FDR menor al 20% (p ≤ 0,20).

## 4.2.1.2. MECANISMOS DE DESTOXIFICACIÓN

La expresión diferencial observada en el gen *lp\_2945* (*lpdC*) se correlaciona con lo descrito en apartados anteriores donde se establece que *L. plantarum* lleva a cabo la degradación del ácido gálico mediante una descarboxilación no oxidativa mediada por la enzima galato descarboxilasa que origina la producción de dióxido de carbono y pirogalol, contribuyendo a garantizar un ambiente reductor, en el cual esta especie microaerófila es capaz de llevar a cabo de forma óptima las rutas metabólicas necesarias para resistir el estrés que se deriva de la disminución en el pH del medio circundante y del ambiente pro-oxidante que se origina a concentraciones elevadas del sustrato. Curiel (2010) demostró que esta enzima se induce por su sustrato y después de 1 hora de inducción la proteína ya está sintetizada y es activa. Los resultados de este estudio indican que la inducción de los genes es inmediata y proporcional, pero no en razón directa a la concentración del compuesto fenólico. A una concentración de 1,5 mM de ácido gálico la magnitud del cambio observado en el gen *lp\_2945* es de 108 veces, mientras que a 15 mM se tiene un incremento en el nivel de transcripción de 272 veces (Tabla XI). Se ha descrito que el ácido gálico y protocatéquico incrementan el nivel de expresión del gen *lpdC* (*lp\_2945*) (Curiel, 2010). En este estudio, conjuntamente a la inducción del gen *lp\_2945* que codifica la subunidad C de la galato descarboxilasa, también se observa el incremento, pero en menor medida, de los genes *lpdB* (*lp\_0271*, subunidad B; aproximadamente 20 y 26 veces) y de *lpdD* (*lp\_0272*, subunidad D; 19 y 24 veces) (Figura 20).



**Figura 20.** Expresión diferencial de los genes relacionados con la actividad galato descarboxilasa en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido gálico 15 mM. Los genes con una inducción en sus niveles de transcripción se presentan de color rojo y los que se reprimen en color verde. Tonalidades brillantes corresponden a incrementos elevados. Tonalidades oscuras corresponden a variaciones cercanas a 1,5-2 veces con respecto al control (FC>1,5; p<0,05; FDR<0,05).R: regulador transcripcional; PM: proteína de membrana; T: transportador.

Esto coincide con los resultados obtenidos en los estudios realizados de la galato descarboxilasa donde se demuestra que por lo menos las subunidades B y C están involucradas en la degradación del ácido gálico y aunque, en otras descarboxilasas de los ácidos aromáticos se ha descrito la participación de *lp\_0272*, hasta la fecha se desconoce su papel en esta especie, al igual que el de la proteína codificada por *lp\_0274* definida como un regulador transcripcional de la familia TetR (con una inducción de 4 veces a ambas concentraciones). La subunidad C (LpdC) de la enzima galato descarboxilasa constituye la subunidad catalítica principal, mientras que la subunidad B (LpdB) posiblemente participa en la maduración (“refolding”) o activación de LpdC (Jiménez *et al.*, 2013). Por otra parte, los altos niveles de expresión del gen *lp\_2943* anotado como el responsable de la síntesis de una posible proteína transportadora de cationes, en conjunto con los resultados de estudios predictivos que definen la localización subcelular de esta proteína en la membrana con altas probabilidades de anclarse por su extremo N-terminal y de presentar un péptido señal (Zhou *et al.*, 2008), indican su posible participación en fenómenos de transporte asociados a esta biotransformación.

En la tabla XI se observa que los niveles de transcripción de gen *lp\_2956* que codifica la enzima tanasa (LpTan1) aumentaron con respecto al control 4 y 10 veces en presencia del ácido gálico a 1,5 y 15 mM, respectivamente; bajo un patrón que sugiere que a mayor concentración del compuesto, mayor es el nivel de inducción que se produce. En un estudio reciente mediante RT-qPCR que evaluó en *L. plantarum* WCFS1 los niveles de transcripción de diversos genes biomarcadores de supervivencia en el TGI, también se demostró la inducción de la expresión de este gen en presencia de ácido tánico a concentraciones de 0,5-2mM (con cambios de 4 y 12 veces) (Reverón *et al.*, 2013). Durante la caracterización bioquímica de la tanasa de *L. plantarum* 748<sup>T</sup> se ha descrito que la enzima purificada puede catalizar *in vitro* la hidrólisis de los enlaces ésteres presentes en galotaninos, taninos hidrolizables como el ácido tánico, ésteres del ácido gálico y ésteres del ácido protocatéquico; donde en todos los casos, se produce ácido gálico (Curiel, 2010). Sin embargo, cultivos de esta cepa crecidos en presencia de ácido tánico (0,1-0,5 mM) son incapaces de metabolizar éste compuesto (Rodríguez, 2009). Se ha sugerido que el ácido tánico no es transportado al interior de la célula y los resultados de los estudios predictivos realizados por Zhou *et al.* (2008) señalan que la localización subcelular de la proteína codificada por el gen *lp\_2956* es citoplasmática; de tal forma que hipotéticamente su actividad sobre el ácido tánico sólo puede ocurrir si la enzima es liberada al medio extracelular vía lisis celular u otro mecanismo aún desconocido.

Osawa *et al.* (1995) presentaron que algunas cepas de *Streptococcus gallolyticus* hidrolizaban taninos y descarboxilaban el ácido gálico. Posteriormente, O'Donovan y Brooker (2001) describieron que la inducción de la galato descarboxilasa posiblemente es un factor crítico en la tolerancia que presentaba *S. gallolyticus* frente al ácido tánico. El incremento en los niveles de transcripción de *lp\_2956* de *L. plantarum* WCFS1 en presencia del ácido gálico sugiere la posible existencia de una red de regulación que controla simultáneamente la expresión de los genes responsables de la síntesis de las enzimas galato descarboxilasa y tanasa. Para el primer caso se tiene una inducción por sustrato mientras que en el segundo se puede interpretar como un mecanismo de control tipo “feedback” positivo, donde el producto de la reacción de hidrólisis de los enlaces éster presentes en el ácido tánico (mediante actividad microbológica o por autodegradación), induce la actividad tanasa. Una inducción temprana de la expresión de este gen puede interpretarse como una señal de alarma y de protección a la población microbiana, que lleva a la síntesis de la enzima con antelación al momento en el que las células estarían expuestas a elevadas concentraciones de la sustancia tóxica. Sin embargo, es posible que el mecanismo de regulación de la actividad de la enzima tanasa sea complejo debido a que generalmente las esterasas pueden catalizar tanto las reacciones de síntesis como de hidrólisis de los ésteres, dependiendo de las condiciones en el medio de reacción (Fernández-Lorente *et al.*, 2011). Esta propiedad catalítica no se ha observado en otras tanasas y es actualmente tema de investigación de otros estudios.

Los niveles de transcripción del gen *lp\_2940*, que codifica una posible proteína precursora que se localiza en la superficie celular, aumentaron de forma marcada en presencia del ácido gálico a ambas concentraciones estudiadas: 10 veces mayor al control a 1,5 mM y 14 veces a una concentración de 15 mM (Tabla XI). Se ha descrito que *Lp\_2940* contiene un motivo LPQTG similar a LPXTG (“LPXTG-like motif”) que permite su anclaje a la pared celular (Bron *et al.*, 2004b; Zhou *et al.*, 2008) o su traslocación al ambiente extracelular por un sistema Sec-dependiente (Sec-SPI) (Zhou *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010).

Bron *et al.* (2004b) estudiaron mediante el uso de la “tecnología de expresión *in vivo*” (IVET) el perfil de expresión de los genes en células de *L. plantarum* WCFS1 durante su tránsito por el TGI de ratones y lo compararon con el patrón mostrado por células cultivadas *in vitro* en medio completo. Se identificaron un total de 72 genes cuya expresión se induce en el ambiente intestinal y entre ellos se han descrito cuatro genes que codifican proteínas extracelulares e incluyen a *lp\_2940*. Estos autores sugieren que la función de estas proteínas de superficie, que se

anclan a la pared bacteriana, es mediar en la interacción con las células del ambiente intestinal o con componentes excretados en el lumen del TGI del hospedador. Posteriormente, en un intento por conocer los mecanismos de adaptación que le permiten a *L. plantarum* sobrevivir a través de su paso por el sistema digestivo de los mamíferos, se investigó en ratones la expresión de 15 genes *ivi* (“*in vivo*-inducible”) en el tiempo y en los diferentes compartimientos intestinales (Marco *et al.*, 2007). Este estudio determinó que la transcripción del gen *lp\_2940* se induce significativamente durante la estancia de la bacteria en la zona distal del intestino delgado (yeyuno e ileon) y en el ciego. Por otra parte, no se observaron alteraciones en este gen en las células recuperadas del estómago, duodeno y colon.

La localización del gen *lp\_2940* cerca de los genes responsables de la actividad galato descarboxilasa, sugiere su posible participación en la respuesta al estrés derivado de la presencia del ácido gálico por mecanismos aún desconocidos.

A 15 mM se observó una leve inducción en los niveles de expresión de los genes *lp\_1424* y *lp\_1425*. El gen *lp\_1425* se ha descrito como el responsable de la síntesis de una flavo-proteína dependiente de NADPH que reduce el fumarato usando menaquinol y que podría neutralizar las especies ROS que se producen durante el estrés oxidativo (van Hellemond y Tielens, 1994).

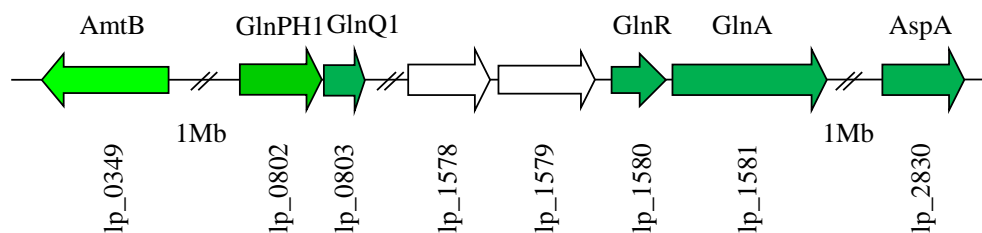
#### 4.2.1.3. CAMBIOS RELACIONADOS CON PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE LA MEMBRANA Y PARED CELULAR Y AHORRO DE ENERGÍA

De los 24 genes que presentaron una disminución en sus niveles de expresión en presencia de ácido gálico a una concentración de 15 mM, la mitad codifican posibles proteínas de membrana, en su mayoría transportadores del tipo ABC (“ATP -binding cassette”) (*lp\_0747*, *lp\_0748*, *lp\_0802*, *lp\_0803*, *lp\_2739*, *lp\_2740*, *lp\_2743* y *lp\_2744*), proteínas asociadas a la membrana (*lp\_0349*, *lp\_2363* y *lp\_2741*) o proteínas secretoras (*lp\_3015*).

La inhibición de la expresión de los genes *lp\_2739* a *lp\_2744* (posiblemente formando un operón) se asoció a modificaciones en la membrana y pared celular. Se ha descrito que ciertas permeasas del tipo ABC, así como también proteínas reguladoras de la familia GntR, están involucradas en la regulación negativa de la formación de “biofilm” y de la síntesis de proteínas de superficie celular y de anclaje a la pared celular (“LPXTG-like motif”) en *Listeria monocytogenes* (Zhu *et al.*, 2011; Wassinger *et al.*, 2013).

El gen *lp\_0349* (*amtB*) responsable de la síntesis de un transportador de amonio presentó a ambas concentraciones estudiadas, el nivel más alto de represión, en un modelo que parece ser dependiente de la concentración del compuesto añadido (3 veces menor a 1,5 mM y 7,3 veces a 15 mM) (Tabla XI). Esta proteína está relacionada con las proteínas transportadoras de membrana y se ha descrito que en su estructura posee un canal hidrofóbico para el amonio (Conroy *et al.*, 2007). En *Escherichia coli* se ha demostrado que la actividad de AmtB se requiere para la normal excreción de ácidos; sin embargo, se sobre-expresa en condiciones limitantes de nitrógeno y se reprime cuando las concentraciones de nitrógeno en el exterior aumentan ( $\geq 50$   $\mu\text{M}$ ) con la finalidad de prevenir su paso al citoplasma, donde el amonio podría combinarse con el glutamato para formar glutamina en una reacción que consume ATP a expensas de un agotamiento de las reservas de ATP celular (Conroy *et al.*, 2007). La inhibición de *lp\_2830* (*aspA*) se relacionó con la necesidad de disminuir el amonio intracelular.

Todo parece indicar que las células de *L. plantarum*, en presencia de ácido gálico, comienzan a modificar la maquinaria enzimática con el fin de prevenir el consumo innecesario de energía en forma de ATP ya que, igual a lo descrito para *E. coli*, además del gen del transportador AmtB, también disminuyen de forma significativa los niveles de transcripción de los genes *lp\_1581* (2,5 veces; que codifica la enzima glutamina sintasa o glutamato-amonio ligasa GlnA), de *lp\_0802* (3,1 veces; responsable por la síntesis de la subunidad GlnPH1 de unión al sustrato) y de *lp\_0803* (2,2 veces; subunidad GlnQ1 de unión al ATP), de un transportador de glutamina tipo ABC. Por último, la expresión del gen *lp\_1580* (*glnR*) descrito como el responsable de la regulación de la síntesis de glutamina disminuyó en un nivel equivalente (2,0 veces) (Figura 21).



**Figura 21.** Expresión diferencial de los genes regulados por GlnR en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido gálico 15 mM. Los genes con una inducción en sus niveles de transcripción se presentan de color rojo y los que se reprimen en color verde. Tonalidades brillantes corresponden a incrementos con diferencias elevadas. Tonalidades oscuras corresponden a variaciones cercanas a 1,5-2 veces con respecto al control ( $FC > 1,5$ ;  $p < 0,05$ ;  $FDR < 0,05$ ). R: regulador transcripcional.



Los estudios de Chen *et al.* (2010) revelaron que GlnR está involucrado en la tolerancia de *Streptococcus mutans* al ambiente ácido y controla la transcripción de los genes que codifican las enzimas que participan en la síntesis de glutamina a pH bajo. La represión de los genes que dependen de GlnR posiblemente re-direcciona el flujo del carbono de citrato a piruvato con el consumo de protones en un proceso de homeostasis que le permite a la bacteria adaptarse rápidamente al ambiente ácido extracelular.

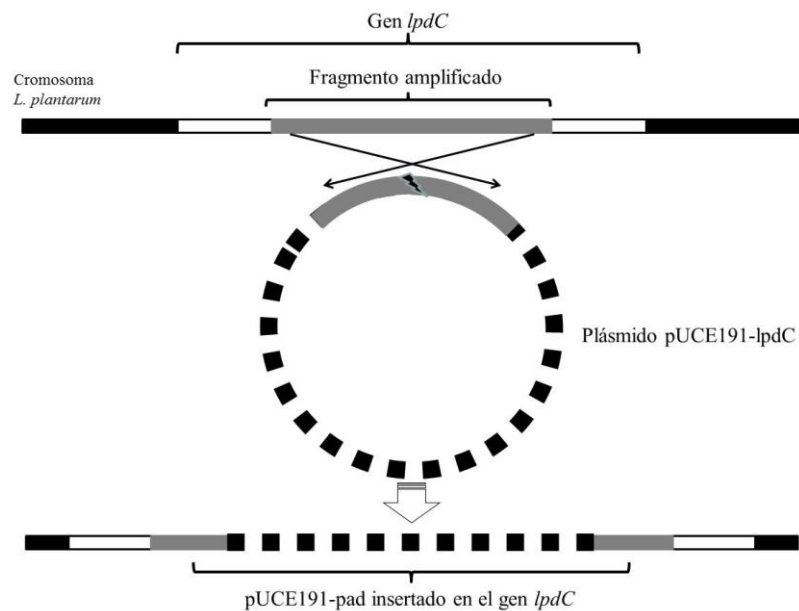
El gen *lp\_2363* codifica la subunidad epsilon ( $\epsilon$ ) de la ATP sintasa. Se ha descrito que la subunidad  $\epsilon$  actúa como un inhibidor endógeno de la actividad ATPasa y que tanto la concentración de ATP como las variaciones en el potencial de membrana influyen en su conformación y de ésta forma en su modo de acción (Yasuno *et al.*, 2009). Un análisis del nivel de expresión de los genes que codifican el resto de las subunidades de esta enzima (genes *lp\_2364* hasta *lp\_2370*) no reflejó cambios consistentes a un nivel de probabilidad menor, por lo que se asume que la represión observada únicamente para *lp\_2363* (2,9 veces) podría ser un reflejo de alteraciones puntuales en el potencial de membrana y no de una respuesta específica a la presencia del ácido gálico.

#### 4.2.1.4. INTERRUPCIÓN DEL GEN *LPDC* EN *L. PLANTARUM*

De los resultados del análisis de micromatrices de ADNc que demuestran el alto nivel de inducción del gen *lp\_2945* (*lpdC*) en presencia del ácido gálico y según los resultados previos a este estudio que sugieren que LpdC es la subunidad catalítica principal en la reacción de descarboxilación de este compuesto fenólico (Jiménez *et al.*, 2013); es posible inferir que en ausencia de esta enzima las células de *L. plantarum* estarían sometidas a un elevado estrés debido a la imposibilidad garantizar el elevado ambiente reductor necesario para resistir el desequilibrio electrolítico y el ambiente oxidativo que se desencadena cuando éste ácido fenólico se presenta a concentraciones elevadas. Por ello se decidió evaluar el efecto del ácido gálico sobre el crecimiento de una cepa mutante WCFS1 $\Delta$ lpdC que posee el gen *lp\_2945* (*lpdC*) no funcional.

La cepa mutante se obtuvo a partir de células electrocompetentes de *L. plantarum* WCFS1 transformadas con el plásmido pUCE191-lp2945. Para ello en el plásmido pUCE191 (Arrecubieta *et al.*, 1995) se clonó un fragmento interno de 380 pb (denominado *lpdC\**) del gen *lpdC* amplificado mediante los oligonucleótidos 469 y 470 (Curiel, 2010). Una vez obtenido el

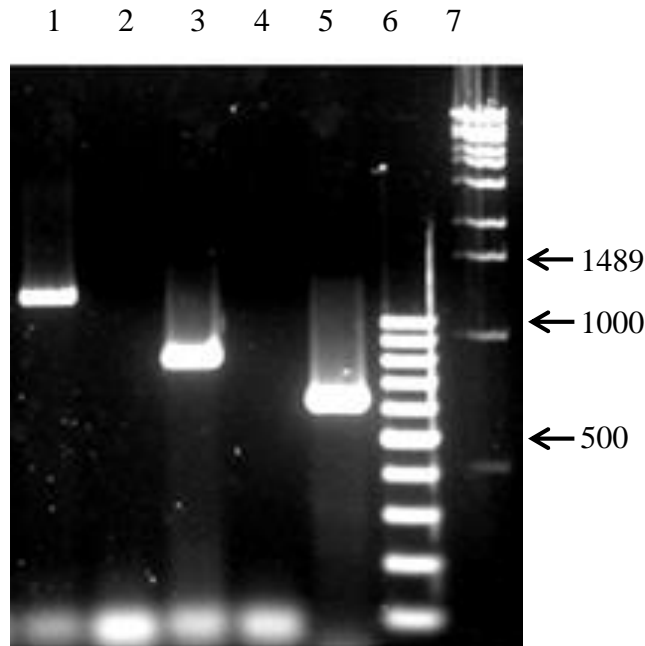
plásmido pUCE191-lpdC se llevó a cabo la transformación de la cepa *L. plantarum* WCFS1 según el protocolo descrito por Aukrust y Blom (1992). El pUCE191 se comporta como un plásmido integrativo y no replicativo durante la transformación de *L. plantarum* por lo que se obtienen bajas frecuencias de transformación (alrededor de  $10^5$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de plásmido). La recombinación homóloga que se produce entre el fragmento interno *lpdC*\* clonado en el plásmido y la copia del gen *lpdC* presente en el cromosoma de la bacteria da origen a la interrupción del gen a través de un mecanismo de inserción-duplicación que lleva a la integración del plásmido pUCE191-pad en el cromosoma de la bacteria (Figura 22).



**Figura 22.** Recombinación homóloga producida entre el plásmido pUCE191-lpdC (línea pespunteada con el fragmento *lpdC*\* en gris) y el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1 en la región del gen *lpdC*. La inserción del pUCE191-lpdC ocasiona la interrupción del gen *lpdC*.

La correcta integración del plásmido se comprobó mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 1224 que hibrida en el plásmido, y 388 que hibrida en una región externa al fragmento *lpdC*\* en la zona inicial del gen *lpdC*, obteniendo un producto amplificado de 1086 pb. También se incluyó la amplificación de un fragmento del gen que codifica la resistencia a eritromicina (oligonucleótidos 697 y 698 que amplifican un fragmento cercano a 800 pb), y se

corroboró que el gen *lpdC* completo no se amplifica debido a la incorporación de la secuencia del plásmido en el genoma de la bacteria (oligonucleótidos 387 y 388 que amplifican cerca de 1470 pb del gen completo) (Figura 23).



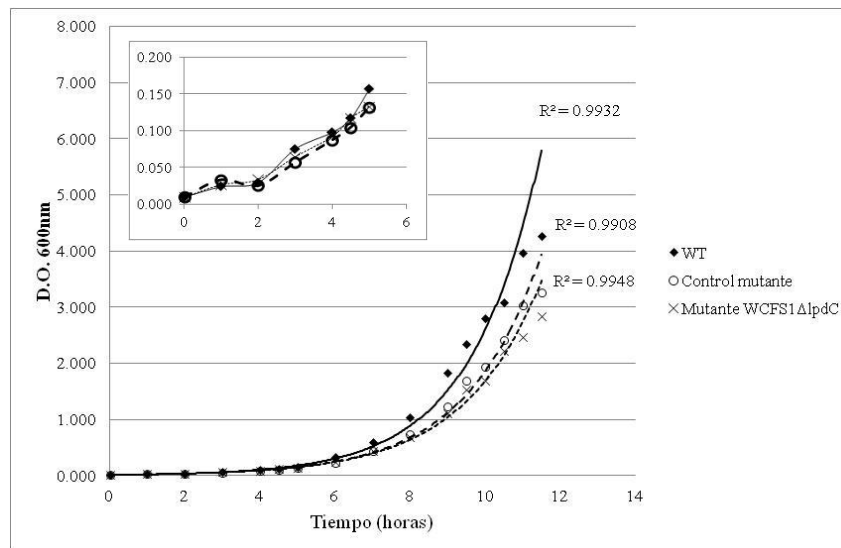
**Figura 23.** Verificación de la interrupción de gen *lpdC* (*lp\_2945*) por inserción del plásmido pUCE191-*lpdC* vía recombinación homóloga en *L. plantarum* WCFS1. Fragmento “inicio gen *lpdC*-plásmido pUCE191” amplificado con los oligonucleótidos 388+1224 (1); amplificación del gen completo *lpdC* con 387+388 (2); amplificación de un fragmento del gen eritromicina con oligonucleótidos 697+698 (3); control negativo sin ADN con oligonucleótidos 697+698 (4); control positivo con ADN de WCFS1 y oligonucleótidos 518+519 banda de 600 pb (5); marcador guía de 100 pb (6); marcador guía Lambda-EcoT14 I.

#### 4.2.1.5. INFLUENCIA DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *LP\_2945* (*LPDC*) EN EL CRECIMIENTO DE *L. PLANTARUM* EN PRESENCIA DE ÁCIDO GÁLICO

Una vez confirmada la correcta inserción del plásmido pUCE191-*lpdC* con la consiguiente interrupción del gen *lpdC* se procedió a evaluar el patrón de crecimiento de este mutante. La cepa silvestre “wild type” (WT) y el mutante WCFS1Δ*lpdC* se crecieron en medio MRS líquido suplementado con ácido gálico a 15 mM puesto que ya se demostró que a esta

concentración es superior el número de genes que alteran su expresión. Una cepa control WCFS1 $\Delta$ lp\_2942, que lleva una mutación equivalente pero en un gen cuya deficiencia no se relaciona con el metabolismo de este ácido fenólico también se incluyó en el estudio. El estudio se realizó en medio no suplementado de antibiótico para garantizar que los cambios observados son un reflejo de la mutación y no de la presión selectiva ejercida por el antibiótico.

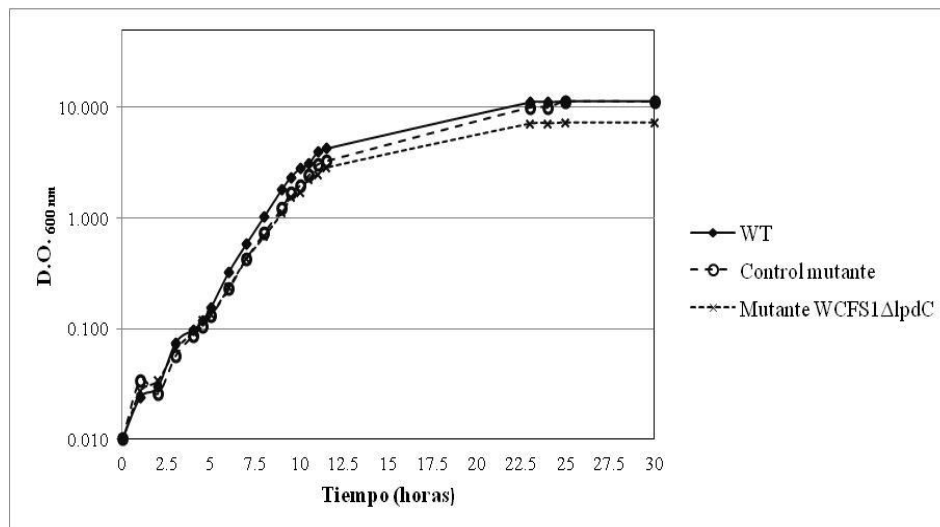
En la figura 24 se puede observar que las tres cepas ensayadas muestran curvas de crecimiento similares durante las primeras 12 horas, tal y como se demuestra al comparar las ecuaciones y los coeficientes del análisis de regresión exponencial ( $R^2 > 0,99$ ) aplicado a los datos (con  $Y = M * E^{rx}$  donde, Y es el incremento de la biomasa, M es la biomasa inicial, r es la tasa de crecimiento instantáneo, x el tiempo t y  $E = 2,71828$ ; ver Materiales y Métodos). La velocidad de crecimiento fue levemente menor en la cepa WCFS1  $\Delta$ lpdC (tasa de crecimiento de 0,48 unidades vs. 0,53 y 0,50 unidades para las cepas silvestre y WCFS1 $\Delta$ lp\_1426, respectivamente). El ácido gálico se añadió a las tres horas de haber iniciado el crecimiento.



**Figura 24.** Comparación mediante un ajuste de regresión exponencial del incremento en la biomasa de la cepa mutante WCFS1 $\Delta$ lpdC deficiente en la expresión del gen *lpdC* vs. la cepa silvestre “wild type” (WT) de *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido gálico 15 mM. El aumento en la biomasa (OD<sub>600</sub>) en función del tiempo (horas) se analizó durante 14 horas cada 30 min y después cada 8 horas hasta las 30 horas. La cepa mutante deficiente en *lp\_1426* (gen no relacionado) se usó como control de la mutación. El recuadro superior insertado en la gráfica presenta una ampliación del intervalo comprendido entre  $t=0$  y  $t=6$ . Se aplicó un ajuste de regresión exponencial a través del cual se estableció que las diferencias no son significativas (WT:  $y=0,012e^{0,5371x}$ ; WCFS1 $\Delta$ lpdC:  $y=0,0133e^{0,4836x}$ ; WCFS1 $\Delta$ lp\_1426:  $y=0,0121e^{0,5031x}$ ). Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

En la curva de crecimiento de la cepa WCFS1 $\Delta$ lpdC, con el gen *lpdC* interrumpido, no se observó una variación significativa en los valores de DO<sub>600</sub> o un cambio en la velocidad de crecimiento después de añadir el ácido gálico (durante el periodo comprendido entre t=3 y t=7) (Figura 24, recuadro superior izquierdo). Sin embargo, a partir de t=8 la velocidad de crecimiento de la cepa WCFS1 $\Delta$ lpdC disminuye con respecto a la cepa control WCFS1 $\Delta$ lp\_1426 y dicha diferencia se hace mayor a partir del tiempo t=11 dando como resultado una disminución en la biomasa a partir de las 24 horas (Figura 25).

Este cambio de comportamiento tardío o con retraso, posiblemente indica que las células se multiplican más lentamente como consecuencia de utilizar la energía en reacciones alternativas de desintoxicación o que experimentan una entrada prematura en la fase estacionaria debido al esfuerzo realizado para resistir el estrés.



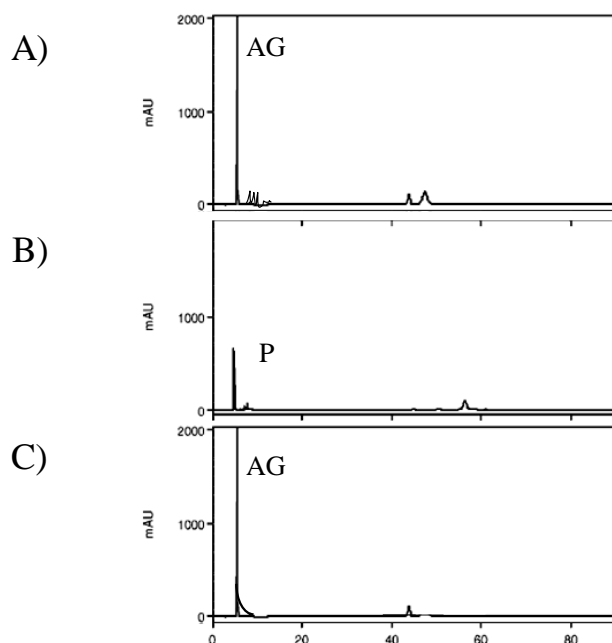
**Figura 25.** Efecto del ácido gálico a 15 mM en el crecimiento de la cepa mutante WCFS1 $\Delta$ lpdC deficiente en la expresión del gen *lpdC* que codifica la enzima galato descarboxilasa vs. la cepa silvestre “wild type” (WT) de *L. plantarum* WCFS1. Las células se crecieron en medio MRS líquido. La cepa mutante deficiente en *lp\_1426* (gen no relacionado) se usó como control de la mutación. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Existen varias hipótesis que explican el patrón de crecimiento observado. Puede ser que el ácido fenólico, al no poder ser metabolizado por la ausencia de la enzima galato descarboxilasa se transporte eficientemente al exterior celular a través de una proteína transportadora en un fenómeno asociado al consumo de energía; por otro lado, la acumulación del ácido puede producir cambios en la pared y membrana celular que igualmente involucran el uso de energía, y finalmente, también puede ocurrir que otra enzima o ruta se active y participe para llevar a cabo una transformación alternativa menos eficiente, con lo cual el crecimiento no se detiene del todo y solo experimenta un retraso.

#### 4.2.1.6. INTERRUPCIÓN DEL GEN *LP\_2945* (*LPDC*) EN *L. PLANTARUM* Y METABOLISMO DEL ÁCIDO GÁLICO

En cuanto a la tercera posibilidad, Curiel (2010) demostró que cultivos de WCFS1 $\Delta$ lpdC en presencia de ácido gálico 1 mM son incapaces de realizar la descarboxilación de éste sustrato para formar pirogalol. De hecho los resultados de los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) indican que el compuesto fenólico se acumula y permanece intacto en el medio de cultivo después de 7 días de incubación (Figura 26).

Posteriormente, y coincidiendo con la inducción del gen *lp\_0271*, Jiménez *et al.* (2013) describieron que cultivos equivalentes con la cepa mutante WCFS1 $\Delta$ lpdB, que presenta el gen *lp\_0271* no funcional, tampoco llevan a cabo la degradación del ácido gálico, demostrándose que al menos bajo las condiciones evaluadas, tanto el gen *lp\_2945* como el gen *lp\_0271* son necesarios para la degradación del ácido gálico y que no ocurre una biotransformación alternativa.

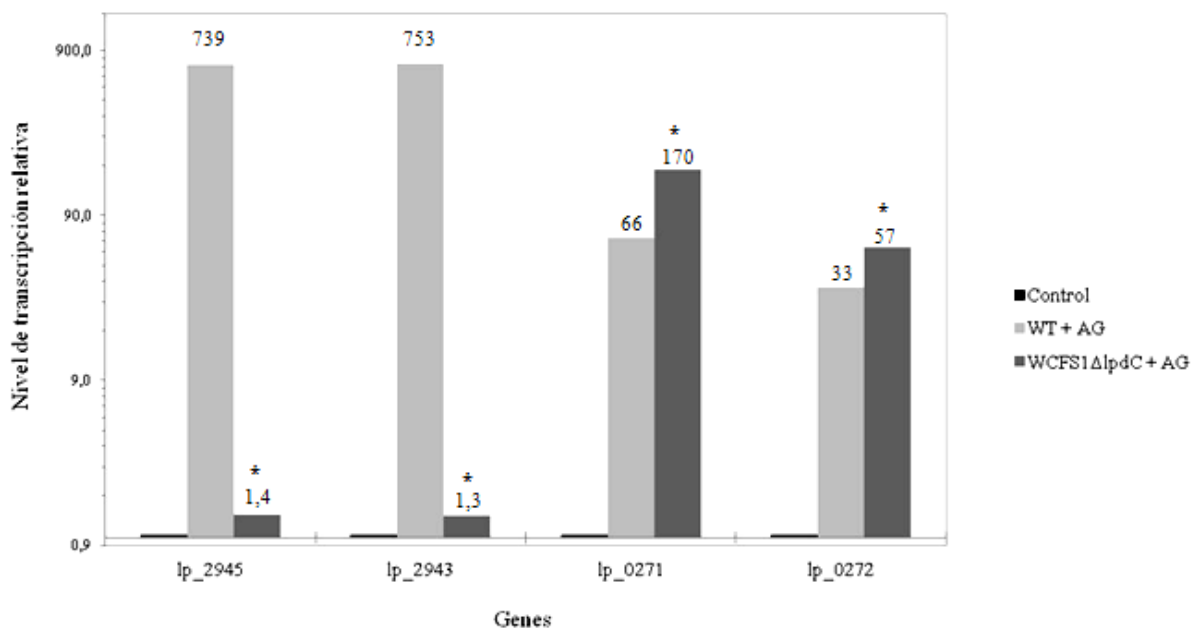


**Figura 26.** Degradación del ácido gálico por la cepa mutante *L. plantarum* WCFS1ΔlpdC (A) y *L. plantarum* WCFS1 (WT) (B). Se incluye un control del sustrato en medio RPM (C). Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 7 días en medio RPM conteniendo ácido gálico 1 mM. AG: ácido gálico, P: pirogalol.

#### 4.2.1.7. INFLUENCIA DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *LP\_2945* (*LPDC*) EN EL PATRÓN DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS PRINCIPALES GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DEL ÁCIDO GÁLICO

Sobre la base de lo expuesto en los párrafos anteriores, se planteó la posibilidad de que la ausencia de actividad galato descarboxilasa, debido a la interrupción del gen *lp\_2945*, podría producir alteraciones en el patrón de regulación transcripcional de los principales genes que presentan cambios en sus niveles de expresión, en respuesta al ajuste requerido para poder resistir la presencia del ácido gálico que se acumula en el medio. Por ello se decidió estudiar mediante RT-qPCR el nivel de expresión de los genes *lp\_2943*, *lp\_0271* (*lpdB*) y *lp\_0272* (*lpdD*) en la cepa mutante WCFS1ΔlpdC. Se obtuvo el ARN de las células cultivadas en presencia del compuesto y una vez purificado se utilizó para sintetizar el ADNc mediante la enzima transcriptasa inversa (ver detalles en Materiales y Métodos). La cuantificación relativa del nivel de expresión de cada gen se realizó en un ensayo de RT-qPCR empleando los oligonucleótidos descritos en la tabla V y utilizando el gen *ldhD* como control endógeno.

Los resultados demuestran que la deficiencia del gen *lp\_2945* (*lpdC*) afecta de manera marcada la transcripción del gen *lp\_2943*, así como también los niveles de expresión de los genes *lp\_0271* (*lpdB*) y *lp\_0272* (*lpdD*) que codifican las otras subunidades de la enzima galato descarboxilasa (Figura 27). El bajo o nulo nivel de transcripción de *lp\_2943* posiblemente se debe a la presencia de un operón entre *lp\_2945* y *lp\_2943*, por lo que al interrumpir *lpdC* se interrumpe la transcripción del gen contiguo. Se ha descrito que *lp\_2943* codifica una posible proteína transportadora de cationes que puede estar involucrada en el transporte del ácido gálico.



**Figura 27.** Nivel relativo de transcripción de los genes *lp\_2945*, *lp\_2943*, *lp\_0271* y *lp\_0272* en la cepa mutante WCFS1Δ*lpdC* con el gen *lpdC* (*lp\_2945*) interrumpido en presencia de ácido gálico 15 mM. Control: *L. plantarum* WCFS1 sin inducir (cultivo control); WT + AG: *L. plantarum* WCFS1 inducido con ácido gálico 15 mM durante 10 min; WCFS1Δ*lpdC* + AG: cepa mutante de *L. plantarum* WCFS1 con el gen *lpdC* interrumpido inducida en idénticas condiciones a la cepa WT. \*:diferencias significativas ( $p > 0,01$ ).

En ausencia de la LpdC, la inhibición conjunta de la síntesis del transportador tiene significancia biológica por cuanto impide que el ácido fenólico pase al interior de las células. El aumento significativo en los niveles de inducción de los genes *lp\_0271* y *lp\_0272* puede considerarse una prueba adicional a favor de la participación de estos genes en el metabolismo del ácido gálico. Se conoce poco acerca de los mecanismos que regulan la expresión de estos

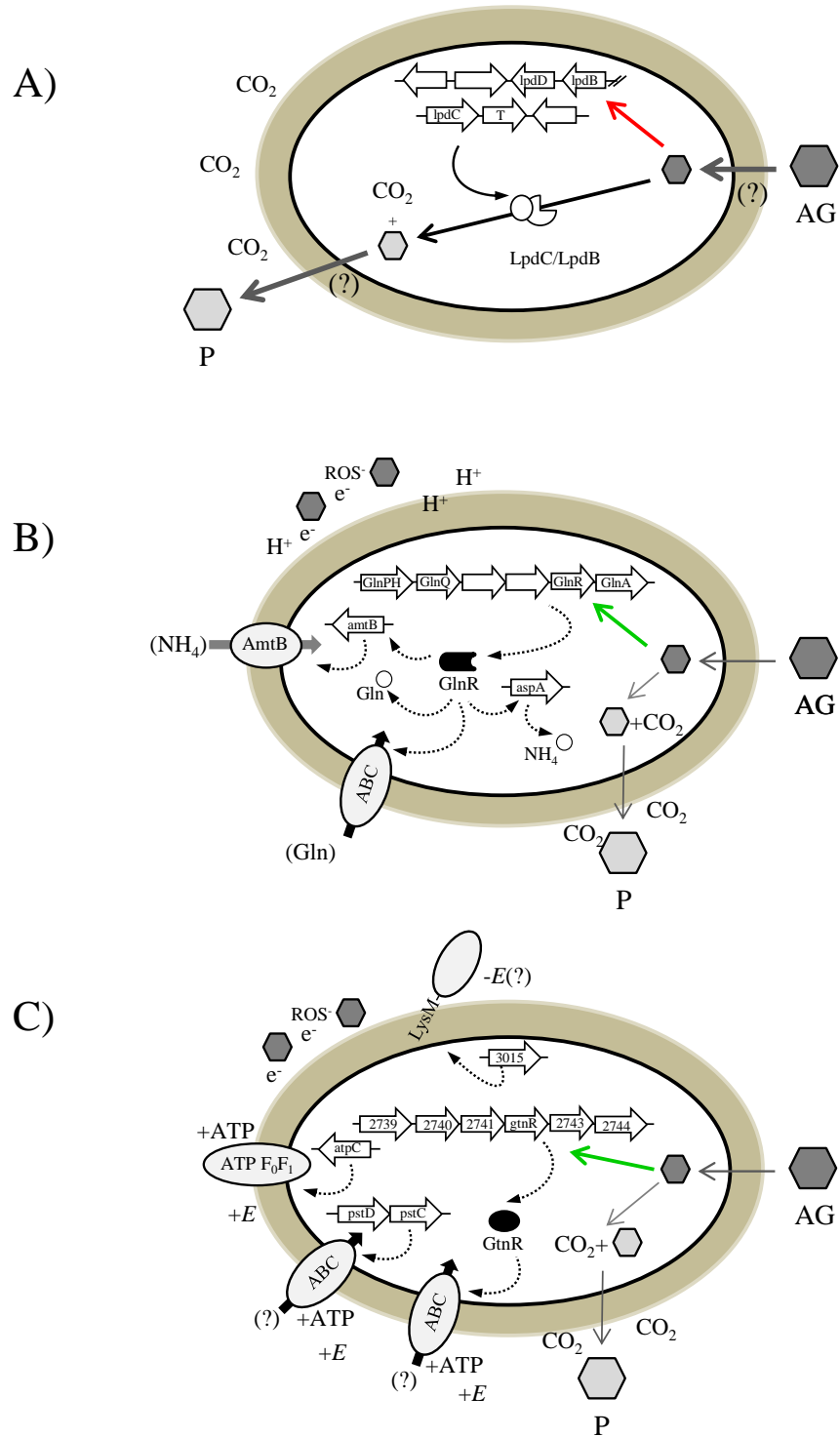


genes y estudios futuros basados en el análisis de micromatrices de ADNc empleando la cepa WCFS1 $\Delta$ lpdC probablemente aportarían información valiosa al respecto.

En la figura 28 se hace una representación esquemática de los posibles mecanismos de tolerancia y adaptación que utiliza *L. plantarum* frente al ácido gálico. Una revisión completa del patrón de expresión génica observado a ambas concentraciones indica que la descarboxilación mediada por la enzima galato descarboxilasa es muy eficaz y constituye la ruta metabólica principal de biotransformación.

El aumento en la concentración del ácido gálico (de 1,5 a 15 mM) causa la alteración de genes que se relacionan con el uso eficiente de las fuentes de energía e incluyen la activación del flujo del carbono vía piruvato por la inhibición de la síntesis de glutamina y la inhibición del transporte de amonio. Paralelamente, se observa la inhibición de genes asociados al transporte de membrana (transportadores tipo ABC) y continúan sin presentarse indicios relevantes de fenómenos de estrés oxidativo o general.

Por último, en ausencia de la actividad galato descarboxilasa, se sugiere que la imposibilidad de garantizar un ambiente reductor (a través de la síntesis de dióxido de carbono) junto con la acumulación del ácido en el exterior (ya sea porque el ácido permanece fuera de la célula o es expulsado activamente), originan cambios en la pared y membrana celular que van acompañados de un consumo importante de energía en detrimento del crecimiento de la población celular.



**Figura 28.** Representación esquemática de los posibles mecanismos de tolerancia y adaptación asociados a la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 en presencia del ácido gálico. Descarboxilación no oxidativa (A); inhibición del transporte de amonio (B) y de la síntesis de glutamina (C). AG: ácido gálico; P: pirogalol; +E: consumo de energía; +ATP: consumo de ATP. Las flechas roja (inducción), verde (represión), negra continua (activación) y negra discontinua (inhibición) se refiere a la expresión de los genes o a la síntesis de las proteínas codificadas por cada gen.

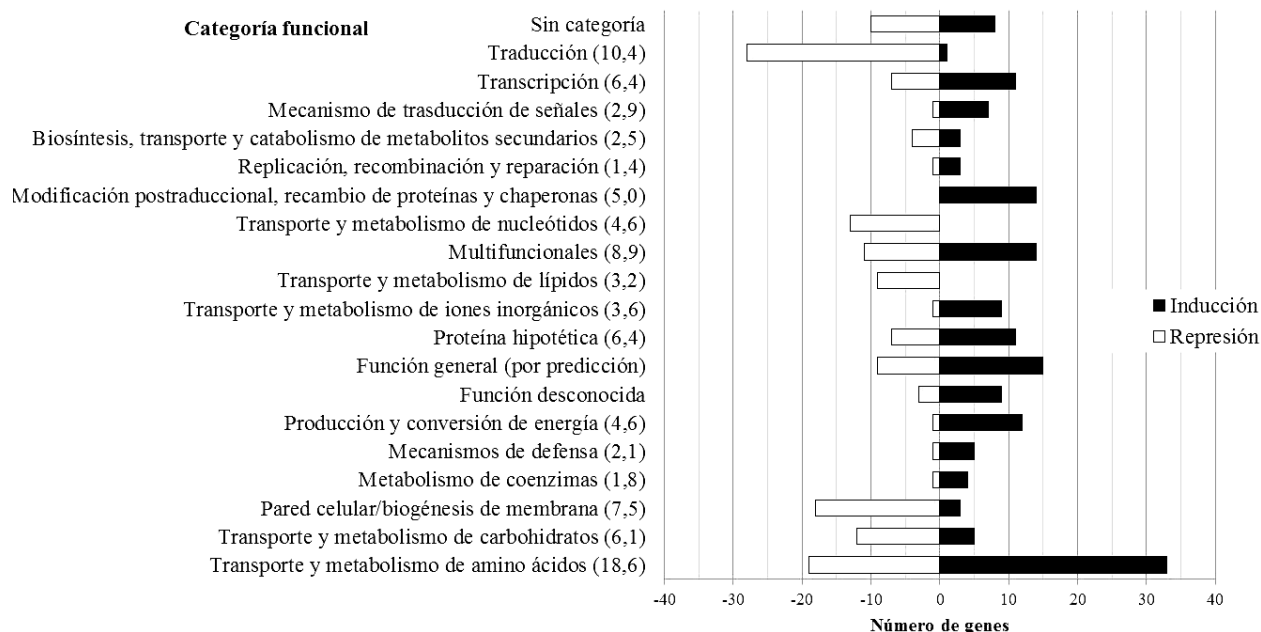
#### 4.2.2. RESPUESTA TRANSCRIPTÓMICA DE *L. PLANTARUM* WCFS1 EN PRESENCIA DE ÁCIDO *p*-CUMÁRICO

Los resultados del análisis transcriptómico en presencia del ácido *p*-cumárico reflejan que los mecanismos involucrados en la interacción microorganismo-compuesto fenólico son más complejos que lo observado para el caso del ácido gálico. De igual forma a lo establecido para el ácido gálico, en el análisis de los datos consideró aquellos genes cuyo nivel de transcripción mostró cambios de al menos  $\pm 1,5$  (FDR<0,05 y  $p < 0,05$ ).

##### 4.2.2.1. VISIÓN GENERAL

Los datos revelaron que aproximadamente el 9% de los genes exhibieron una expresión diferencial en respuesta a la exposición al ácido *p*-cumárico. De 3066 genes representados en la micromatriz, se observó la inducción de 144 y la represión de 136, lo que representa un total de 280 genes afectados. La totalidad de los genes regulados diferencialmente se asociaron a las categorías funcionales CGO (“Clusters of Orthologous Groups”; Tatusov *et al.*, 2003) (Apéndice A). La distribución por categorías funcionales indica que el grupo más numeroso de genes con inducción en sus niveles de transcripción forman parte de la CGO de transporte y metabolismo de aminoácidos (n=33), seguido por modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas (n=14), transcripción (n=11), metabolismo y transporte de iones inorgánicos (n=9), mecanismos de traducción de señales (n=7), metabolismo y transporte de carbohidratos (n=5), mecanismos de defensa (n=5) y proteínas hipotéticas no categorizadas o desconocidas (n=11). En el caso de los genes que disminuyen su expresión, la mayoría caen dentro de ocho categorías funcionales que incluyen traducción (n=28), transporte y metabolismo de aminoácidos (n=19), pared celular y/o biogénesis de membrana (n=18), metabolismo y transporte de nucleótidos (n=13), metabolismo y transporte de carbohidratos (n=12), metabolismo y transporte de lípidos (n=9), transcripción (n=7) y proteínas hipotéticas no categorizadas o desconocidas (n=7) (Figura 29). En conjunto el 19% de los genes expresados diferencialmente corresponden a la CGO transporte y metabolismo de aminoácidos, 10% a traducción y 8% a pared celular y/o biogénesis de membrana. Paralelamente se observó que todos los genes de las categorías de (i) transporte y metabolismo de nucleótidos, (ii) transporte y metabolismo de lípidos y (iii) traducción presentan una disminución en sus niveles de expresión; en el mismo orden de ideas se observó la inducción

de la totalidad de los genes clasificados en la categoría funcional modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas.



**Figura 29.** Expresión génica por categorías funcionales en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. Referido al número de genes cuya expresión se induce o reprime más de 1,5 veces con respecto al control. En paréntesis se detalla el porcentaje de genes diferencialmente expresados por cada categoría (FC>1,5; p<0,05; FDR<0,05).

El nivel más alto de inducción observado fue de 112 veces para el gen *lp\_3665* (*pdc*) que codifica la enzima descarboxilasa del ácido *p*-cumárico en *L. plantarum* (Cavin, *et al.*, 1997a), mientras que el nivel más elevado de represión correspondió al gen *lp\_2799*, que hipotéticamente codifica una proteína involucrada en el transporte de aminoácidos, siendo 5,5 veces menor su expresión con respecto al control. En las tablas XII y XIII se presentan los 50 genes con los máximos niveles de inducción y de represión, respectivamente, ordenados de mayor a menor e indicando la presencia de posibles unidades transcripcionales u operones (en color). La inducción del operón formado por los genes *lp\_3665* (*pdc*), *lp\_3664* (*padR*) y *lp\_3663*, éstos dos últimos en menor intensidad, se discutirá en detalle en la sesión de mecanismos de detoxificación (ver punto 4.2.2.2.) De la presencia de múltiples grupos de genes organizados en “clusters” se deduce que la respuesta de *L. plantarum* frente al ácido *p*-cumárico incluye la co-regulación de genes que se inducen o reprimen para adaptarse rápidamente a los cambios ambientales.

**Tabla XII.** Los 50 principales genes inducidos en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en presencia del ácido *p*-cumárico 1,5 mM.. Colores iguales indican posibles operones.

| Gen ID         | Locus        | Descripción   | Magnitud del cambio <sup>a</sup> | FDR (LIMMA) <sup>b</sup> |
|----------------|--------------|---|----------------------------------|--------------------------|
| <i>lp_3665</i> | <i>pdc</i>   | descarboxilasa del ácido <i>p</i> -cumárico   | 112,09                           | 0,00351009               |
| <i>lp_1261</i> | <i>oppA</i>  | transportador ABC de oligopéptidos, subunidad de unión al sustrato                        | 21,43                            | 0,00090871               |
| <i>lp_1425</i> | -            | fumarato reductasa, flavoproteína uniendo FAD FMN reductasa dependiente de NADPH          | 19,72                            | 0,00070647               |
| <i>lp_0990</i> | -            | proteína hipotética <i>lp_0990</i>  | 19,47                            | 0,00063873               |
| <i>lp_0991</i> | -            | proteína transportadora multidroga  | 17,45                            | 0,00069678               |
| <i>lp_0992</i> | -            | proteína hipotética <i>lp_0992</i>  | 16,72                            | 0,00075725               |
| <i>lp_1424</i> | -            | proteína familia de las FMN reductasas dependientes de NADPH                              | 15,28                            | 0,00705988               |
| <i>lp_1262</i> | <i>oppB</i>  | transportador ABC de oligopéptidos, permeasa  | 11,07                            | 0,00079988               |
| <i>lp_0129</i> | <i>hsp1</i>  | proteína "small heat shock"   | 10,45                            | 0,00479907               |
| <i>lp_1264</i> | <i>oppD</i>  | transportador ABC de oligopéptidos, proteína de unión al ATP                              | 10,29                            | 0,00124181               |
| <i>lp_2393</i> | -            | precursor de lipoproteína   | 10,23                            | 0,00080970               |
| <i>lp_1265</i> | <i>oppF</i>  | transportador ABC de oligopéptidos, proteína de unión al ATP                              | 9,96                             | 0,00137362               |
| <i>lp_1263</i> | <i>oppC</i>  | transportador ABC de oligopéptidos, permeasa  | 9,91                             | 0,00141934               |
| <i>lp_2395</i> | -            | transportador ABC, proteína de unión al ATP y permeasa                                    | 9,80                             | 0,00128102               |
| <i>lp_2394</i> | -            | transportador ABC, proteína de unión al ATP y permeasa                                    | 8,75                             | 0,00122356               |
| <i>lp_1426</i> | -            | proteína hipotética <i>lp_1426</i>  | 7,20                             | 0,00268797               |
| <i>lp_2035</i> | <i>aroE</i>  | 3-fosfosikimato 1-carboxiviniltransferasa   | 6,04                             | 0,00412257               |
| <i>lp_2036</i> | -            | proteína hipotética <i>lp_2036</i>  | 5,95                             | 0,00505765               |
| <i>lp_2708</i> | <i>pucR</i>  | regulador del transporte de purinas   | 5,57                             | 0,00309394               |
| <i>lp_2034</i> | <i>tyrA</i>  | prefenato dehidrogenasa   | 5,14                             | 0,00910019               |
| <i>lp_2037</i> | <i>aroF</i>  | corismato sintasa   | 5,10                             | 0,00385787               |
| <i>lp_1269</i> | <i>clpE</i>  | proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad ClpE de unión al ATP                           | 4,63                             | 0,02110512               |
| <i>lp_1083</i> | <i>tkt2</i>  | transcetolasa   | 4,47                             | 0,01003692               |
| <i>lp_3352</i> | <i>hsp3</i>  | proteína "small heat shock"   | 4,23                             | 0,02034429               |
| <i>lp_3125</i> | -            | fumarato reductasa, subunidad precursora de la flavoproteína, truncada en el N-terminal   | 4,02                             | 0,01283461               |
| <i>lp_0786</i> | <i>clpP</i>  | proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad proteolítica                                   | 3,94                             | 0,01893901               |
| <i>lp_3664</i> | <i>padR</i>  | regulador del metabolismo de los ácidos fenólicos, PadR                                   | 3,86                             | 0,00779290               |
| <i>lp_2033</i> | <i>aroI</i>  | sikimato quinasa  | 3,84                             | 0,00701950               |
| <i>lp_1903</i> | <i>clpB</i>  | proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad ClpB de unión al ATP                           | 3,81                             | 0,01400045               |
| <i>lp_2804</i> | -            | regulador transcripcional   | 3,79                             | 0,00988931               |
| <i>lp_3338</i> | <i>nha2</i>  | Na(+)/H(+) antiporter   | 3,77                             | 0,01723768               |
| <i>lp_1084</i> | <i>aroD1</i> | shikimate 5-dehidrogenase   | 3,66                             | 0,01983710               |
| <i>lp_2537</i> | <i>metA</i>  | metA homoserina O-succiniltransferasa   | 3,59                             | 0,02534493               |
| <i>lp_1746</i> | -            | transportador ABC de amino ácidos, proteína de unión al sustrato                          | 3,53                             | 0,03520068               |
| <i>lp_0018</i> | -            | precursor de lipoproteína, proteína OppA de unión a péptidos                              | 3,49                             | 0,01097291               |
| <i>lp_0433</i> | -            | proteína hipotética <i>lp_0433</i>  | 3,49                             | 0,01826608               |
| <i>lp_2038</i> | -            | proteína de transporte  | 3,48                             | 0,01605559               |
| <i>lp_1590</i> | -            | proteína integral de membrana   | 3,44                             | 0,00807624               |
| <i>lp_2658</i> | -            | glucosiltransferasa (putativa)  | 3,36                             | 0,00744697               |
| <i>lp_1085</i> | <i>aroA</i>  | 3-deoxi-7-fosfoheptulonato sintasa  | 3,31                             | 0,01919311               |
| <i>lp_1949</i> | -            | proteína integral de membrana   | 3,26                             | 0,00976884               |
| <i>lp_3337</i> | -            | proteína hipotética <i>lp_3337</i>  | 3,24                             | 0,02539815               |
| <i>lp_0861</i> | -            | proteína de transporte de amino ácidos (putativa)   | 3,21                             | 0,01130336               |
| <i>lp_1948</i> | -            | regulador transcripcional   | 3,20                             | 0,01123447               |
| <i>lp_2536</i> | <i>metY</i>  | O-acetilhomoserina (tiol)-liasa   | 3,18                             | 0,01649913               |
| <i>lp_0535</i> | -            | proteína hipotética <i>lp_0535</i>  | 3,06                             | 0,01013280               |
| <i>lp_2029</i> | <i>hrcA</i>  | represor de la transcripción inducible por calor (heat-inducible transcription repressor) | 3,01                             | 0,02744844               |
| <i>lp_0989</i> | -            | proteína integral de membrana   | 2,99                             | 0,01472629               |
| <i>lp_0294</i> | -            | regulador transcripcional (putativo)  | 2,98                             | 0,04409942               |
| <i>lp_0201</i> | -            | precursor de lipoproteína, proteína OppA de unión a péptidos                              | 2,95                             | 0,02526748               |

<sup>a</sup> Cambio en la expresión en número de veces en cultivos con ácido *p*-cumárico en relación a cultivos sin suplementar.

<sup>b</sup> FDR menor al 5% ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla XIII.** Los 50 principales genes reprimidos en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en presencia del ácido *p*-cumárico 1,5 mM. Colores iguales indican posibles operones.

| Gen ID         | Locus         | Descripción  | Magnitud del cambio <sup>a</sup> | FDR (LIMMA) <sup>b</sup> |
|----------------|---------------|--|----------------------------------|--------------------------|
| <i>lp_2799</i> | -             | proteína de transporte de amino ácidos   | -5,45                            | 0,00341074               |
| <i>lp_3015</i> | -             | proteína extracelular  | -5,07                            | 0,00523336               |
| <i>lp_1035</i> | <i>rpIW</i>   | L23 proteína 50S ribosomal   | -4,61                            | 0,03924883               |
| <i>lp_3049</i> | -             | proteína de transporte de amino ácidos   | -4,57                            | 0,00682431               |
| <i>lp_0349</i> | <i>amtB</i>   | proteína de transporte de amonio   | -4,50                            | 0,01068125               |
| <i>lp_1036</i> | <i>rplB</i>   | L2 proteína 50S ribosomal  | -4,34                            | 0,02870085               |
| <i>lp_3014</i> | -             | proteína extracelular  | -4,29                            | 0,00491390               |
| <i>lp_1041</i> | <i>rplP</i>   | L16 proteína 50S ribosomal   | -4,14                            | 0,03324961               |
| <i>lp_1032</i> | <i>rpsJ</i>   | S10 proteína 30S ribosomal   | -4,03                            | 0,04949868               |
| <i>lp_1033</i> | <i>rplC</i>   | L3 proteína 50S ribosomal  | -4,03                            | 0,04795202               |
| <i>lp_1670</i> | <i>fabZ1</i>  | (3R)-hidroximiristoil-(proteína acil-transportadora) deshidratasa                      | -3,97                            | 0,01536884               |
| <i>lp_1671</i> | <i>fabH2</i>  | 3-oxoacil-(proteína acil-transportadora) sintasa III                                   | -3,97                            | 0,01286099               |
| <i>lp_0620</i> | <i>rplA</i>   | L1 proteína 50S ribosomal  | -3,83                            | 0,03043650               |
| <i>lp_1039</i> | <i>rpIV</i>   | L22 proteína 50S ribosomal   | -3,74                            | 0,03679863               |
| <i>lp_1672</i> | <i>acpA2</i>  | proteína acil-transportadora   | -3,69                            | 0,03416738               |
| <i>lp_1034</i> | <i>rplD</i>   | L4 proteína 50S ribosomal  | -3,67                            | 0,02797962               |
| <i>lp_1673</i> | <i>fabD</i>   | (proteína acil-transportadora) S-maloniltransferasa                                    | -3,63                            | 0,03028065               |
| <i>lp_1175</i> | <i>glpF4</i>  | proteína facilitadora para la toma de glicerol   | -3,52                            | 0,01257202               |
| <i>lp_0302</i> | -             | proteína extracelular  | -3,47                            | 0,01129083               |
| <i>lp_1040</i> | <i>rpsC</i>   | S3 proteína 30S ribosomal  | -3,29                            | 0,02281453               |
| <i>lp_1044</i> | <i>rpsQ</i>   | S17 proteína 30S ribosomal   | -3,23                            | 0,04012089               |
| <i>lp_1045</i> | <i>rplN</i>   | L14 proteína ribosomal   | -3,14                            | 0,03296749               |
| <i>lp_0255</i> | <i>metC1</i>  | cistationina beta-liasa  | -3,08                            | 0,02128955               |
| <i>lp_0304</i> | -             | proteína extracelular  | -3,01                            | 0,00990881               |
| <i>lp_1051</i> | <i>rplF</i>   | L6 proteína 50S ribosomal  | -3,01                            | 0,03786585               |
| <i>lp_1038</i> | <i>rpsS</i>   | S19 proteína 30S ribosomal   | -2,99                            | 0,03310124               |
| <i>lp_1674</i> | <i>fabG1</i>  | 3-oxoacil-(proteína acil-transportadora) reductasa                                     | -2,97                            | 0,03065525               |
| <i>lp_1184</i> | <i>cps1H</i>  | glicosiltransferasa (rhamnosiltransferasa)   | -2,96                            | 0,03537202               |
| <i>lp_1046</i> | <i>rplX</i>   | L24 proteína ribosomal   | -2,92                            | 0,04940972               |
| <i>lp_1515</i> | <i>infC</i>   | factor de iniciación de la trasducción IF-3  | -2,91                            | 0,03178380               |
| <i>lp_1050</i> | <i>rpsH</i>   | S8 proteína 30S ribosomal  | -2,84                            | 0,03639851               |
| <i>lp_0802</i> | <i>glnPHI</i> | transportador ABC glutamina, protein de unión al sustrato y permeasa                   | -2,83                            | 0,02351259               |
| <i>lp_1675</i> | <i>fabF</i>   | 3-oxoacil-(proteína acil-transportadora) synthase II                                   | -2,82                            | 0,02324963               |
| <i>lp_3085</i> | <i>asnB2</i>  | asparagina sintasa (glutamina-hidrolizante)  | -2,75                            | 0,02730266               |
| <i>lp_0984</i> | -             | proteína hipotética <i>lp_0984</i>   | -2,75                            | 0,01760199               |
| <i>lp_2739</i> | -             | transportador ABC, proteína de unión al ATP  | -2,72                            | 0,01703308               |
| <i>lp_3358</i> | -             | proteína transportadora  | -2,72                            | 0,01400994               |
| <i>lp_1182</i> | <i>cps1F</i>  | proteína de biosíntesis de exopolisacárido   | -2,71                            | 0,02631390               |
| <i>lp_0256</i> | <i>cysK</i>   | cisteína sintasa   | -2,71                            | 0,04532857               |
| <i>lp_2712</i> | -             | proteína transportadora  | -2,70                            | 0,01576327               |
| <i>lp_3394</i> | -             | proteína hipotética <i>lp_3394</i>   | -2,70                            | 0,04474099               |
| <i>lp_0622</i> | <i>rplL</i>   | proteína ribosomal L12/L7  | -2,68                            | 0,04208961               |
| <i>lp_0262</i> | <i>treR</i>   | regulador transcripcional  | -2,67                            | 0,03499654               |
| <i>lp_1181</i> | <i>cps1E</i>  | aciltransferasa/acetiltransferasa  | -2,67                            | 0,02125085               |
| <i>lp_3421</i> | -             | proteína extracelular, gamma-D-glutamato meso-diaminopimelato muropeptidasa (putativa) | -2,64                            | 0,01784689               |
| <i>lp_1047</i> | <i>rplE</i>   | L5 proteína 50S ribosomal  | -2,62                            | 0,04141331               |
| <i>lp_1179</i> | <i>cps1C</i>  | transportador  | -2,61                            | 0,03965510               |
| <i>lp_0263</i> | <i>treA</i>   | alpha, alpha-fosfotrehalasa  | -2,61                            | 0,01748600               |
| <i>lp_2240</i> | -             | proteína de transporte de amino ácidos   | -2,59                            | 0,01746325               |
| <i>lp_0254</i> | <i>cysE</i>   | serina O-acetiltransferasa   | -2,58                            | 0,03477602               |

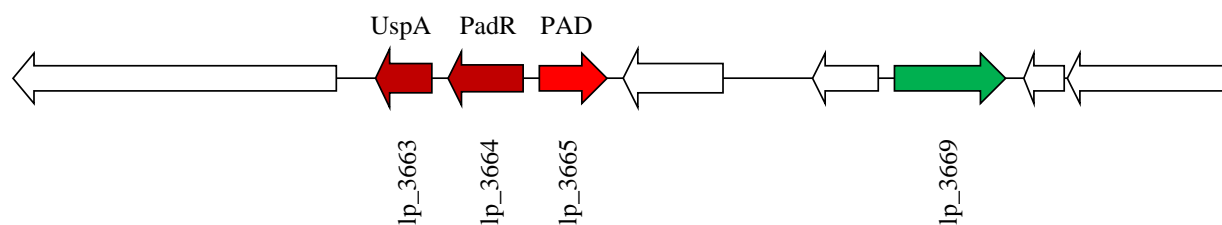
<sup>a</sup> Cambio en la expresión en número de veces en cultivos con ácido *p*-cumárico en relación a cultivos sin suplementar. El signo negativo indica que la expresión fue inhibida o regulada a la baja con respecto al control.

<sup>b</sup> FDR menor al 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. MECANISMOS DE DESTOXIFICACIÓN

En *S. cerevisiae*, ciertas especies de *Bacillus* y de *Lactobacillus*, entre otras, se ha descrito que en respuesta al estrés inducido por el ácido *p*-cumárico las células sintetizan la enzima descarboxilasa de dicho ácido fenólico (PAD) (Clausen, *et al.*, 1994; Cavin, *et al.*, 1997a; Rodríguez, *et al.*, 2008e). Ya se ha comentado que en *L. plantarum* el gen *pdc* codifica la enzima PAD, proteína que es inducible por sustrato y que lleva a cabo la degradación de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico a sus 4-vinil derivados (4-vinil fenol, 4-vinil catecol y 4-vinil guayacol, respectivamente) en un mecanismo que se sugiere está asociado a contrarrestar el efecto tóxico de éstos ácidos hidroxicinámicos (Cavin *et al.*, 1997b; Landete, *et al.*, 2007; Rodríguez, *et al.*, 2008b; Rodríguez, *et al.*, 2009). En particular, la acción pro-oxidante del ácido *p*-cumárico se debe a su elevado potencial de oxidación (Epa >0,67) (Simic, *et al.*, 2007) y depende de la concentración a la cual éste se encuentre. En este estudio, el alto nivel de inducción mostrado por *L. plantarum* WCFS1 en el gen *pdc* (*lp\_3665*; 112 veces con respecto al control) ratifica que el principal mecanismo de destoxificación frente a este compuesto es su descarboxilación para formar 4-vinil fenol, que posteriormente, se sugiere que bajo el ambiente reductor propiciado por la liberación del dióxido de carbono, se transforma vía una reductasa a 4-etil fenol. El gen *pdc* forma un operón con *padR* (*lp\_3664*), que codifica su regulador transcripcional (PadR), y posiblemente con *lp\_3663*, que codifica una proteína que presenta elevada similitud con la familia de proteínas de estrés universal UspA (Licandro-Seraut *et al.*, 1994; Gury *et al.*, 2004). *lp\_3663* y *lp\_3664* también se inducen pero en niveles menores a *pdc* (2,1 y 3,9 veces, respectivamente) (Figura 30), lo que coincide con resultados de estudios previos obtenidos mediante RT-qPCR (Licandro-Seraut *et al.*, 1994).

El papel de Usp1 se desconoce aunque se ha señalado que tiene cierta capacidad para inactivar PadR (Gury *et al.*, 2009) y actuar como mediador en los mecanismos de respuesta al estrés ácido interactuando con reguladores transcripcionales. Relacionado con esto y en niveles equivalentes a *lp\_3663*, también se observó diferencialmente expresado el gen *lp\_2993* (2 veces inducido) que codifica una posible proteína similar a UspA que en *E. coli* se ha asociado a una respuesta frente a agentes que dañan el ADN o actúan como desacopladores de la cadena respiratoria (Kvint *et al.*, 2003).



**Figura 30.** Expresión diferencial de los genes regulados por PadR en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. El gen *lp\_3669* no está regulado por PadR. Se señalan los genes que presentaron inducción (rojo) o represión (verde) en sus niveles de transcripción. Tonalidades oscuras corresponden a variaciones cercanas a 1,5-2 veces respecto al control (FC>1,5; p<0,05; FDR<0,05). R: regulador transcripcional.

En general, se ha descrito que los genes que codifican proteínas de la familia Usp (UspA, UspC, UspD y UspE) responden a un estrés celular específico (choque térmico, daño del ADN, oxidantes y estados de inanición) y causan una disminución en el crecimiento celular. Las proteínas codificadas por los genes *usp* llegan a ser las más abundantes en las células en fase estacionaria (Gustavsson *et al.*, 2002). Sin embargo, bajo condiciones extremas de temperaturas (>50 °C) o altas concentraciones de etanol (10%) se observa la represión de la transcripción de dichos genes (Kvint, *et al.*, 2003).

La inducción de genes que codifican transportadores de membrana o que están relacionados a éstos, incluyendo los tipo multidrogas, también se relacionó con los eventos de detoxificación. El gen *lp\_0991* (transportador multidroga de la familia MFS) y los genes adyacentes a él, *lp\_0990* (de función desconocida), y *lp\_0992* (presentando similitud con un regulador transcripcional de la familia de los reguladores MerR) mostraron una inducción significativa (17,5; 19,5 y 16,7; veces respectivamente), así como también otros genes que codifican posibles transportadores ABC tipo “exporters” o “effluxers) (*lp\_2394* a *lp\_2395*, con 8,7 y 9,8 veces; y *lp\_2893* a *lp\_2894*, con 2,2 y 2,4 veces). Junto a la familia de transportadores MFS y ABC se tiene un incremento en la transcripción del gen *lp\_3338* que codifica Nha2, proteína antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (3,8 veces) que desempeña un papel en la extrusión de Na<sup>+</sup>, homeostasis del pH y regulación del volumen celular (Kosovo *et al.*, 2000; Padan *et al.*, 2004). Estas proteínas pueden estar relacionadas con el transporte del ácido *p*-cumárico o de sus metabolitos secundarios, que también ejercen cierto grado de inhibición en el crecimiento de *L. plantarum* WCFS1.



#### 4.2.2.3. RUTAS METABÓLICAS GENERALES DE RESPUESTA AL ESTRÉS

La respuesta transcriptómica de *L. plantarum* al ácido *p*-cumárico presentó una inducción masiva de varios genes cuya participación en los procesos relacionados con la adaptación al estrés está bien establecida e incluye a los genes clase I (chaperonas moleculares) y clase III (proteasas dependientes de ATP), así como también los de las proteínas de choque térmico (HSP). Concretamente, se observa la activación entre 1,8 y 4,6 veces de los genes *clpE*, *clpB*, *clpC* y *clpP* (que codifican proteasas) y de *groES*, *groEL*, *dnaJ* y *dnaK* (responsables de la síntesis de chaperonas moleculares que ayudan al plegamiento de otras proteínas) (Tabla XIV).

Los genes *grpE*, *hsp1* (*lp\_0129*) y *hsp3* (*lp\_3352*) se indujeron de 3,1 a 10,5 veces, al igual que los genes *asp1* (2,7 veces) y *asp2* (2,5 veces) (proteínas de choque alcalino).

Relacionado con la pared celular, la expresión de *ftsH* (que codifica una posible proteína FtsH de división celular o metaloproteasa) se indujo 2 veces. Este gen se asocia con la respuesta a choque térmico y se sugiere que desempeña un papel dual como chaperona-proteasa, estando parcialmente bajo el control del represor CtsR de los genes clase III en *L. plantarum* (Fiocco *et al.*, 2009). El análisis de nivel de transcripción del gen *ftsH* bajo la influencia de diversos factores (temperatura, etanol, sales biliares, estrés osmótico y oxidativo, concentraciones limitantes de glucosa y agentes desestabilizantes de la membrana) indica que FtsH podría estar involucrada en la arquitectura de la envuelta celular (Bove *et al.*, 2012).

Por último, los niveles de expresión de los genes que codifican los reguladores transcripcionales HrcA y CtsR involucrados en el control parcial o total de los grupos de genes citados también resultaron incrementados (3 y 2,4 veces, respectivamente).

Aunque inicialmente este grupo de genes se denominaron de estrés térmico, hoy día se sabe que sus niveles de transcripción se elevan frente a situaciones de estrés general como el aumento de la temperatura, la acidificación o alcalinización del medio, la presencia de sustancias inhibitorias o antimicrobianos y los cambios en la presión osmótica.

**Tabla XIV.** Niveles de expresión de los genes de choque térmico Clase I, III y IV y otros relacionados con estrés general en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en presencia del ácido *p*-cumárico 1,5 mM.

| Gen ID         | Locus        | Descripción   | Magnitud del cambio <sup>a</sup> | Categoría funcional principal COG <sup>b</sup>                 |
|----------------|--------------|---|----------------------------------|--|
| <i>lp_0129</i> | <i>hsp1</i>  | proteína pequeña de choque térmico  | 10,45                            | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_0547</i> | <i>ftsH</i>  | proteína de division celular FtsH, dependiente de ATP, zinc metalopeptidasa | 2,01                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_0727</i> | <i>groES</i> | co-chaperonina GroES  | 3,65 <sup>c</sup>                | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_0728</i> | <i>groEL</i> | chaperonina GroEL   | 3,54 <sup>c</sup>                | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_0786</i> | <i>clpP</i>  | proteasa dependiente de ATP Clp, subunidad proteolítica                     | 3,94                             | Multifuncional <sup>d</sup>                                    |
| <i>lp_1018</i> | <i>ctsR</i>  | regulador transcripcional de los genes de choque térmico clase III          | 2,43                             | Transcripción  |
| <i>lp_1019</i> | <i>clpC</i>  | proteasa dependiente de ATP Clp, subunidad ClpC de unión al ATP             | 2,85                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_1269</i> | <i>clpE</i>  | proteasa dependiente de ATP Clp, subunidad ClpE de unión al ATP             | 4,63                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_1903</i> | <i>clpB</i>  | proteasa dependiente de ATP Clp, subunidad ClpB de unión al ATP             | 3,81                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_2026</i> | <i>dnaJ</i>  | chaperona DnaJ  | 1,77 <sup>c</sup>                | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_2027</i> | <i>dnaK</i>  | chaperona DnaK  | 2,67 <sup>c</sup>                | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_2028</i> | <i>grpE</i>  | proteína de choque térmico GrpE   | 3,05 <sup>c</sup>                | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_2029</i> | <i>hrcA</i>  | repressor transcripcional inducido por calor                                | 3,01                             | Transcripción  |
| <i>lp_3352</i> | <i>hsp3</i>  | proteína de choque térmico pequeña  | 4,23                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |

<sup>a</sup> Magnitud del cambio en número de veces en cultivos crecidos en medio MRS suplementado con ácido *p*-cumárico 1,5 mM en relación a cultivos sin suplementar. Ratios cuyo cambio fue >1,5 veces (tanto en incremento o disminución) fueron expresados diferencialmente con una FDR menor al 5% ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup> Clasificados por grupos funcionales de acuerdo a la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.gov/COG/](http://www.ncbi.nlm.gov/COG/)).

<sup>c</sup> Valores estadísticamente significativos con una FDR entre 5 y 10% ( $0,05 < p \leq 0,1$ ).

<sup>d</sup> Multifuncional: modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas/tráfico intracelular y secreción.

#### 4.2.2.4. ADAPTACIÓN DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES FISIOLÓGICAS

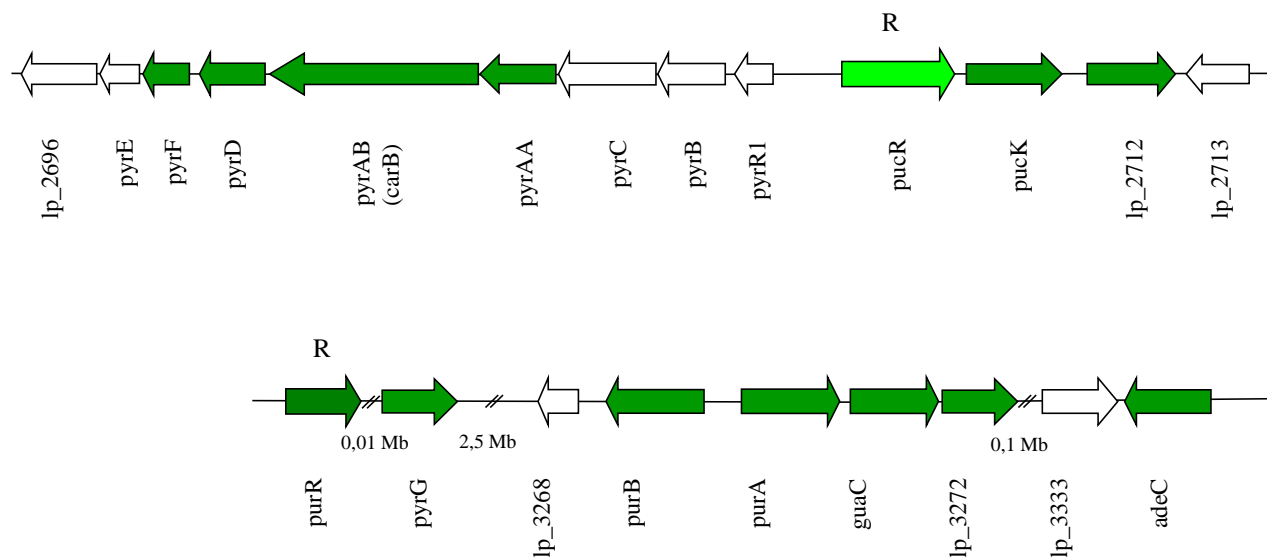
En general los patrones de expresión de los genes involucrados en los procesos fisiológicos de traducción, transporte y metabolismo de lípidos, carbohidratos, purinas y

pirimidinas, también como los relacionados con la biogénesis de membrana y pared celular se modificaron principalmente vía represión.

**4.2.2.4.1. Traducción:** constituye la categoría funcional con el mayor número de genes reprimidos (28 de 136) (Figura 29). El nivel de expresión de 24 genes que codifican proteínas ribosómicas (*lp\_0620*, *lp\_0622*, *lp\_1025*, *lp\_1032* a *lp\_1052*, *lp\_1516*, *lp\_1517* y *lp\_1640*) así como también el de los genes *argS* (*lp\_1391*, arginina-ARNt sintetasa), *lp\_1638* (proteína de procesamiento del ARNr 16S), *lp\_1639* (ARNt metiltransferasa) y *lp\_1515* (factor de iniciación de la traducción) disminuyó entre 1,9 y 4,6 veces (Apéndice A). Durante el crecimiento ocurren reacciones metabólicas complejas cuyo producto principal son los ribosomas. La obtención de ribosomas es uno de los procesos celulares que más energía consume describiéndose que el 60% de la actividad transcripcional está dedicada a la producción de ARN ribosómico (ARNr) y que cerca del 50% de la actividad ARN polimerasa se utiliza en la transcripción de los genes de proteínas ribosómicas (RP) (Warner, 1999). Estudios previos describen una clara relación entre la expresión de los genes RP y cambios en la temperatura, acidez y disponibilidad de aminoácidos, estableciendo que el estrés ocasionado por estas variaciones, incluyendo los cambios de pH, limita la disponibilidad de energía y con ello se incrementa el grado de represión de los genes ribosómicos (Mager, 1988; Joo *et al.*, 2011). A medida que cambian las condiciones del medio ambiente, las células deben ajustar la síntesis de ribosomas con la finalidad de no comprometer en los procesos de transcripción/traducción la totalidad de la energía disponible (Joo *et al.*, 2011).

**4.2.2.4.2. Metabolismo de pirimidinas y purinas:** se observó una represión cercana al doble en los niveles de expresión de cinco genes involucrados en la biosíntesis de pirimidinas (*pyrD*, *pyrF*, *pyrG*, *carB*, *pyrAA*) y de cinco relacionados con la síntesis de *ново* de purinas (*purR*, *purA*, *purB*, *guaC* y *adeC*). En cuanto al transporte de purinas se observó la misma tendencia para los genes *pucK* (proteína de transporte de xantina/uracilo), *lp\_2712* (permeasa xantina/uracilo) y *lp\_0848* (posible proteína de transporte de purinas) (entre 2,1 y 2,7 veces) (Apéndice A). No se observaron alteraciones en la expresión de los genes que componen el operón *purEK1CSQLFMNHD* que va desde *lp\_2729* a *lp\_2719*. La inducción del gen *pucR* (*lp\_2708*) que codifica el regulador de transporte de purinas fue notable (5,6 veces) y posiblemente forma un operón con *pucK* (*lp\_2710*) y *lp\_2712* (Figura 31). Se ha descrito que en *Bacillus subtilis* PucR podría actuar como activador o represor de la expresión de genes en el

operon *pur* (Beier *et al.*, 2002). Los genes *pur* que se han alterado en este estudio están involucrados en la conversión del inosín-5'-monofosfato (IMP) a adenosina-5'-monofosfato (AMP) o guanosina-5'-monofosfato (GMP) y participan en las fases finales de la síntesis de *ново* de los nucleótidos de purinas.



**Figura 31.** Expresión diferencial de los genes que participan en el metabolismo de pirimidinas y purinas en *L. plantarum* WCFS1 y que están bajo la regulación de PucR y PurR en presencia de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. Se señalan los genes que presentaron inducción (rojo) o represión (verde) en sus niveles de transcripción. Tonalidades oscuras corresponden a variaciones cercanas a 1,5-2 veces respecto al control (FC>1,5; p<0,05; FDR<0,05). R: regulador transcripcional.

**4.2.2.4.3. Metabolismo y transporte de carbono:** la presencia del ácido *p*-cumárico afecta negativamente la expresión de 9 genes asociados al transporte de azúcares. Estos genes con un perfil de represión de 2-3,5 veces incluyen tres genes que forman parte del complejo II del sistema de fosfotransferasas (PTS) y codifican permeasas integrales de membrana y fosfotransferasas de azúcares (*pts18CBA*, *pts16ABC* y *pts4ABC*); dos genes localizados “upstream” de *pts16ABC* (*lp\_2097*), *fruK* (*lp\_2096*, 1-fosfofructoquinasa) y *fruR* (*lp\_2095*); dos genes situados “upstream” de *pts4ABC* (*lp\_0264*), el gen *treA* (*lp\_0263*,  $\alpha,\alpha$ -trehalosa) y *treR* (*lp\_0262*); un gen que codifica una posible permeasa involucrada en el consumo de glucosa (*lp\_2503*); y un gen que aparentemente facilita la captación de glicerol (*lp\_1175*, *glpF4*) (Apéndice A). La represión de los niveles de transcripción de genes involucrados en el transporte y utilización de carbohidratos alternativos a la glucosa como trehalosa, fructosa, glicerol y N-

acetilglucosamina (*lp\_2531*, *pts18CBA*) se asocia con una transición a un nuevo estado fisiológico donde el crecimiento se lentifica hasta que se logra contrarrestar el estrés producido. Adicionalmente, se observó una represión en los niveles de expresión del gen que codifica un posible transportador de colina/carnitina/betaina-glicina (*lp\_3324*). Se ha descrito que durante el estrés osmótico las bacterias pueden acumular “solutos compatibles” como prolina y glutamato, aminoácidos derivados de la glicina como betaina y ectoína, y azúcares tales como la trehalosa y la sacarosa con el fin de adaptarse a los cambios de presión rápidamente (Kapfhammer *et al.*, 2005). En algunas especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas concentraciones elevadas de los ácidos hidroxicinámicos originan una membrana permeable con la aparición de canales u orificios (Lou *et al.*, 2012) por lo que la represión de este grupo de genes podría asegurar la localización extracelular de moléculas osmoprotectoras que proveen estabilización a la membrana tal y como se ha sugerido para el caso de la trehalosa (Doung *et al.*, 2006; Ells *et al.*, 2011).

Por otra parte se observó un incremento en el nivel de expresión de genes que codifican enzimas que favorecen el flujo del carbono desde la ruta de las pentosas fosfato hacia metabolitos intermediarios glicolíticos, como el 2-fosfoglicerato, que se consideran fuentes endógenas de energía para la célula (Thompson y Thomas, 1977). Dichos genes incluyen a *lp\_0205* (*pgm1*, fosfoglicerato mutasa; con inducción de 2,2 veces), *lp\_1083* (*tki2*, transcetolasa; con inducción de 4,5 veces) y *lp\_2659* (*xpk1*, fosfocetolasa; con inducción de 2 veces). En cultivos de *L. plantarum* se observó una inducción equivalente en la síntesis de la proteína Pgm en presencia de ácido tánico (Curiel *et al.*, 2011); lo que puede indicar que frente a ambos compuestos fenólicos ocurren adaptaciones metabólicas similares que están encaminadas a conseguir un ahorro de energía.

A pesar de que en *L. plantarum* WCFS1 una parte de la respuesta al estrés inducido por el ácido *p*-cumárico está dedicada a evitar el gasto energético, los procesos fisiológicos involucrados en la respuesta general (genes clase I, clase III y proteínas de choque térmico, entre otros), se asocian a costes energéticos elevados (Tempest y Neijssel, 1984); que son difíciles de compensar si únicamente se dispone de las fuentes endógenas propias de cada célula. Se conoce que el metabolismo y transporte del malato genera gradientes en el pH y potencial de membrana que se utilizan para la obtención de energía; por lo que la inducción (entre 2 y 2,5 veces) de *lp\_1118* y *lp\_1119* que codifican las enzimas maloláctica y malato permeasa, además de *lp\_1082* (malato/lactato deshidrogenasa) y *lp\_3150* (posible malato deshidrogenasa) se asoció a la

producción y conversión de energía a partir de fuentes de carbono alternativas a la glucosa (Poolman *et al.*, 1991).

**4.2.2.4.4. Membrana y pared celular:** el análisis de micromatrices indicó una disminución en los niveles de transcripción (de entre 2,2 y 4 veces) de nueve (desde *lp\_1670* hasta *lp\_1678*) de los 12 genes del locus *fab* que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de lípidos de membrana. Adicionalmente, una proporción elevada de genes *cps* (15 de un total de 37), que se distribuyen en varios “clusters” a lo largo del genoma de *L. plantarum* y que participan en la síntesis de polisacáridos capsulares, al igual que diversas proteínas extracelulares (*lp\_0302*, *lp\_0304*, *lp2845*, *lp\_3014*, *lp\_3015* y *lp\_3421*), presentaron una notable represión con valores entre 1,8 y 5,1 veces (Tabla XV). La proteína codificada por *lp\_0304* presenta alta similitud con factores que promueven la agregación (Apf) a los que se han asociado diversas funciones como la supervivencia durante el tránsito a través del TGI y la participación en las interacciones con las células de la mucosa intestinal (Goh y Klaenhammer, 2010). Estudios previos describen patrones de expresión equivalentes cuando las células de *L. plantarum* se exponen a sustancias tóxicas como el etanol (van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011) o compuestos fenólicos como el ácido ferúlico (Rózes y Peres, 1998) donde la disminución de la expresión de los genes *fab* favorece el incremento del contenido de ácidos grasos insaturados en la bicapa lipídica de la membrana y con ello su plasticidad y fluidez.

En contraste, solo cuatro genes relacionados con la biogénesis de pared y membrana mostraron un aumento en sus niveles de transcripción: *lp\_0769* (D-alanil-D-alanina dipeptidasasa) y *lp\_1245* (D-hidroxi-isocaproato deshidrogenasa) involucrados en la biosíntesis del peptidoglicano (Deghorain *et al.*, 2007; Mainardi *et al.*, 2008) e inducidos más del doble con respecto al control, acompañados por *lp\_1908* (proteína integral de membrana) y *lp\_2659* (glicosiltransferasa) con valores superiores a tres.

**Tabla XV.** Niveles de expresión de genes relacionados con la membrana y pared celular en células de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en presencia del ácido *p*-cumárico 1,5 mM.

| Gen ID         | Locus        | Descripción  | Magnitud del cambio <sup>a</sup> | Categoría funcional principal COG <sup>b</sup> |
|----------------|--------------|--|----------------------------------|--|
| <i>lp_0769</i> | <i>aad</i>   | D-alanil-D-alanina dipeptidasa   | 2,27                             | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_1177</i> | <i>cps1A</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido  | -2,12                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_1178</i> | <i>cps1B</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido  | -1,94                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_1179</i> | <i>cps1C</i> | proteína transportadora  | -2,61                            | Función general (por predicción)               |
| <i>lp_1180</i> | <i>cps1D</i> | glicosiltransferasa  | -2,50                            | Metabolismo y transporte de lípidos            |
| <i>lp_1181</i> | <i>cps1E</i> | aciltransferasa/acetiltransferasa  | -2,67                            | Metabolismo y transporte de carbohidratos      |
| <i>lp_1182</i> | <i>cps1F</i> | proteína de biosíntesis de exopolisacárido   | -2,71                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_1183</i> | <i>cps1G</i> | glicosiltransferasa  | -2,41                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_1184</i> | <i>cps1H</i> | glicosiltransferasa (ramnosiltransferasa)  | -2,96                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_1185</i> | <i>cps1I</i> | polimerasa de polisacárido   | -2,03                            | - <sup>c</sup>                                 |
| <i>lp_1219</i> | <i>glf2</i>  | UDP-galactopiranososa mutasa   | -2,42                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_1220</i> | <i>cps3D</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido (putativa)                                   | -1,90                            | -  |
| <i>lp_1221</i> | <i>cps3E</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido (putativa)                                   | -2,01                            | -  |
| <i>lp_1245</i> | <i>hicD2</i> | L-2-hidroxiisocaproato dehidrogenasa   | 2,31                             | Producción y conversión de energía             |
| <i>lp_1908</i> |              | proteína integral de membrana  | 2,33                             | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_2101</i> | <i>cps4H</i> | polimerasa de polisacárido   | -1,89                            | -  |
| <i>lp_2102</i> | <i>cps4G</i> | glicosiltransferasa  | -1,84                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_2103</i> | <i>cps4F</i> | glicosiltransferasa  | -2,35                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_2106</i> | <i>cps4C</i> | proteína de biosíntesis de exopolisacárido   | -2,34                            | Multifuncional <sup>d</sup>                    |
| <i>lp_1670</i> | <i>fabZ1</i> | (3R)-hidroximiristoil-(proteína transportadora de acilo) dehidratasa                 | -3,97                            | Metabolismo y transporte de lípidos            |
| <i>lp_1671</i> | <i>fabH2</i> | 3-oxoacil-(proteína transportadora de acilo) sintasa III                             | -3,97                            | Metabolismo y transporte de lípidos            |
| <i>lp_1672</i> | <i>acpA2</i> | proteína transportadora de acilo   | -3,69                            | Multifuncional <sup>e</sup>                    |
| <i>lp_1673</i> | <i>fabD</i>  | (proteína transportadora de acilo) S-maloniltransferasa                              | -3,63                            | Metabolismo y transporte de lípidos            |
| <i>lp_1674</i> | <i>fabG1</i> | 3-oxoacil-(proteína transportadora de acilo) reductasa                               | -2,97                            | Multifuncional <sup>e</sup>                    |
| <i>lp_1675</i> | <i>fabF</i>  | 3-oxoacil-(proteína transportadora de acilo) sintasa II                              | -2,82                            | Multifuncional <sup>e</sup>                    |
| <i>lp_1676</i> | <i>accB2</i> | acetil-CoA carboxilasa, proteína transportadora de biotina carboxilo                 | -2,33                            | Metabolismo y transporte de lípidos            |
| <i>lp_1677</i> | <i>fabZ2</i> | (3R)-hidroximiristoil-3-hidroxicanoil-(proteína transportadora de acilo) dehidratasa | -2,52                            | Metabolismo y transporte de lípidos            |
| <i>lp_1678</i> | <i>accC2</i> | acetil-CoA carboxilase, subunidad biotina carboxilasa                                | -2,18                            | Metabolismo y transporte de lípidos            |
| <i>lp_0302</i> |              | proteína extracelular  | -3,47                            | -  |
| <i>lp_0304</i> |              | proteína extracelular  | -3,01                            | -  |
| <i>lp_0617</i> | <i>nusG</i>  | proteína NusG antiterminación de la transcripción                                    | -2,26                            | Transcripción                                  |
| <i>lp_0618</i> |              | hidrolasa de superficie celular, unida a la membrana                                 | -2,16                            | Función general (por predicción)               |
| <i>lp_2658</i> |              | glicosiltransferase (putative)   | 3,36                             | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_2845</i> |              | proteína extracelular  | -1,91                            | -  |
| <i>lp_3014</i> |              | proteína extracelular  | -4,29                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_3015</i> |              | proteína extracelular  | -5,07                            | Biogénesis de membrana y pared                 |
| <i>lp_3421</i> |              | proteína extracelular, gamma-D-glutamato meso-diaminopimelato muropeptidasa          | -2,64                            | Biogénesis de membrana y pared                 |

<sup>a</sup> Magnitud del cambio en número de veces en cultivos crecidos en medio MRS suplementado con ácido *p*-cumárico 1,5 mM en relación a cultivos sin suplementar. Ratios cuyo cambio fue >1,5 veces (tanto en incremento o disminución) fueron expresados diferencialmente con una FDR menor al 5% ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup> Clasificados por grupos funcionales de acuerdo a la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.gov/COG/](http://www.ncbi.nlm.gov/COG/)).

<sup>c</sup> - : Sin categorizar.

<sup>d</sup> Multifuncional: biogénesis de membrana y pared celular / metabolismo y transporte de carbohidratos.

<sup>e</sup> Multifuncional: metabolismo de lípidos / biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios.

Por otra parte, utilizando el modelo oculto de Markov para predecir la presencia de segmentos de transmembrana (TMHMM) en una secuencia determinada de una proteína, la proyección de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de los genes afectados por el ácido *p*-cumárico reveló que aproximadamente el 22% de los genes inducidos y un 30% de los genes reprimidos codifican proteínas que poseen una o más zonas con hélices de transmembrana (Krogh *et al.*, 2001) (Apéndice A). También se consideró entre los cambios asociados a la membrana, la inducción de *serA* (*lp\_0203*; fosfoglicerato deshidrogenasa), gen clave en la biosíntesis del aminoácido serina que es abundante en las proteínas de la cubierta celular de *L. plantarum*, (de Vries, 2006).

La represión de una cantidad importante de genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos (*fab*) y polisacáridos (*cps*), en contraposición con la activación/inhibición de proteínas de membrana y de la superficie celular, incluyendo transportadores, podría interpretarse como un mecanismo de hacinamiento de proteínas de membrana para contrarrestar los efectos tóxicos y estabilizar a la célula frente a una posible disrupción. Así mismo, la inducción de *aad* (*lp\_0769*) y de *hicD2* (*lp\_1245*) se correlaciona bien con el esfuerzo dirigido a mantener la integridad de la membrana, ya que ellos permiten reforzar la envoltura celular mediante modificaciones en los precursores del peptidoglicano (Mainardi *et al.*, 2008).

Estudios proteómicos realizados con cultivos de *L. plantarum* expuestos al ácido tánico también indican una alteración en las proteínas que participan en la síntesis de precursores del peptidoglicano (Curiel *et al.*, 2011).

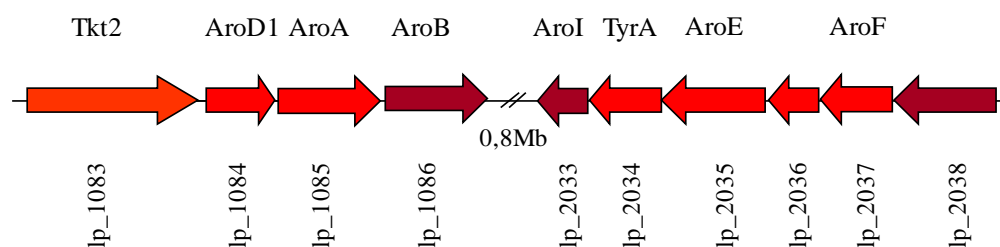
#### 4.2.2.5. RECONFIGURACIÓN DEL METABOLISMO DEL NITRÓGENO

**4.2.2.5.1. Catabolismo de péptidos:** se observó una elevada inducción en la expresión de los genes *opp* que codifican los componentes del transportador de oligopéptidos OppABCDF dependiente de ATP (genes *lp\_1261* a *lp\_1265*; desde 9,9 hasta 21,5 veces,) que interviene en el transporte de oligopéptidos de hasta cinco aminoácidos (Guyer *et al.*, 1986) (Apéndice A). Sistemas de transporte equivalentes participan en la absorción de oligopéptidos y en el reciclaje de los péptidos liberados de la mureína o peptidoglicano que luego se reutilizan en la síntesis de nueva pared celular (Goodell y Higgins, 1987). Este mecanismo podría estar favoreciendo el reciclaje de péptidos liberados de la pared celular a consecuencia del estrés producido por el ácido *p*-cumárico. Más aún, relacionado con el catabolismo de péptidos, se analizó la expresión



diferencial de los genes relacionados con el sistema de peptidasas observando sólo la inducción de *pepN* (*lp\_0937*) y *pepC1* (*lp\_0601*), que codifican peptidasas de amplio rango de especificidad, aunque en una magnitud mucho menor (2,5 y 2,2; respectivamente) que los genes *opp*; lo que sería congruente con el fenómeno de reciclaje de oligopéptidos.

**4.2.2.5.2 Metabolismo y transporte de aminoácidos:** la presencia del ácido *p*-cumárico incrementó significativamente (entre 2,2 y 6 veces) la expresión de dos grupos de genes que incluyen desde *lp\_1083* a *lp\_1086* y desde *lp\_2033* a *lp\_2038* (los “clusters” *tkt2/aroD1/aroA/aroB* y *aroI/tryA/aroE/lp\_2036/aroF/lp\_2038*) que engloban a la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis del corismato, precursor de los aminoácidos aromáticos, entre otros metabolitos (Figura 32).

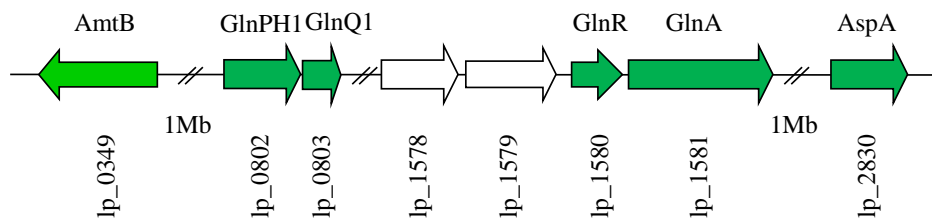


**Figura 32.** Expresión diferencial de los genes que participan en la biosíntesis del corismato en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. Se señalan los genes que presentaron inducción (rojo) o represión (verde) en sus niveles de transcripción. Tonalidades oscuras corresponden a variaciones cercanas a 1,5-2 veces respecto al control (FC>1,5; p<0,05; FDR<0,05). R: regulador transcripcional.

Los resultados también indican un incremento en la transcripción de dos de los tres genes que codifican las proteínas de transporte de aminoácidos de cadena ramificada (AACR) como son *brnQ1* (*lp\_0399*, 2,6 veces) y *brnQ3* (*lp\_3466*, 2,3 veces) aunque menor que el observado para los genes de la biosíntesis de corismato (Apéndice A). En *L. plantarum* la sobre-producción de estas transportadores es esperable puesto que están ausentes las rutas que conducen a la biosíntesis *de novo* de los AACR. La expresión de *brnQ2* (*lp\_2213*) se observó disminuida en 2,2 veces, lo que indica que posiblemente su regulación sea independiente, más aún cuando en esta especie está ausente CodY, el regulador de la biosíntesis de estas proteínas en *L. lactis* y otras bacterias Gram-positivas (Kleerebezem *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2006).

La inducción de los genes *asnA* (*lp\_0957*) y *asnS1* (*lp\_0956*), que codifican las enzimas asparagina sintetasa, y asparaginil-ARNt sintetasa, y de su regulador *asnC* (*lp\_2521*) sugiere que la disponibilidad de asparagina (Asn) es limitada o que las células requieren concentraciones superiores de este aminoácido. Se ha descrito que AsnA lleva a cabo la síntesis de Asn solo bajo condiciones de exceso de nitrógeno (Poggio *et al.*, 2002), sin embargo, el esfuerzo de las células de *L. plantarum* por mantener los niveles de dicho aminoácido también se percibe en la disminución de la expresión de los genes *aspA*, *purA* y *purB* (*lp\_2830*, *lp\_3270* y *lp\_3271*) que codifican las enzimas involucradas en la disipación del aspartato a través de la ruta que alimenta, vía el fumarato, al ciclo incompleto de los ácidos tricarboxílicos. La represión del gen *asnB* (*lp\_3085*, sintetasa de asparagina) en 2,75 veces, coincide con lo observado en *E. coli*, donde la activación *asnB* toma lugar solo bajo condiciones limitantes de nitrógeno, en un mecanismo antagónico a la activación de *asnA* (Poggio *et al.*, 2002). La enzima AsnB se diferencia de AsnA en que puede usar como donador de nitrógeno tanto el amonio como la glutamina (Kölling y Lother, 1985). Sobre la base de lo expuesto se sugiere una adaptación metabólica a la presencia del ácido *p*-cumárico que se traduce en un incremento en la producción de asparagina. En estudios de la expresión génica en plantas, la acumulación de este aminoácido vía la activación de la asparagina sintetasa se ha interpretado como una forma transitoria e inocua de almacenar nitrógeno en respuesta al estrés abiótico y biótico (Canales *et al.*, 2010).

Contrario a Asn, el análisis transcriptómico indica una disminución en la producción de glutamina (Gln) ya que se observó una represión del doble en la transcripción de *glnA* y *glnR* (*lp\_1581* y *lp\_1580*), que codifican la glutamato-amonio ligasa y el regulador global del metabolismo del nitrógeno. En bacterias Gram-positivas estos dos genes forman el operón *glnRA* que es autoregulado por GlnR (Gunka y Commichau, 2012; Kormelink *et al.*, 2012). Paralelamente, también se observó la represión de los genes que codifican dos transportadores ABC de glutamina (*lp\_0802/lp\_0803* y *lp\_2110/lp\_2111*) de forma similar a lo descrito en el análisis transcriptómico de la respuesta de *L. plantarum* al ácido gálico. Se sugiere que esta adaptación re-direcciona el flujo del carbono de citrato a piruvato con el consumo de protones en un proceso de homeostasis que le permite a la célula adaptarse rápidamente a ambientes de elevada acidez.



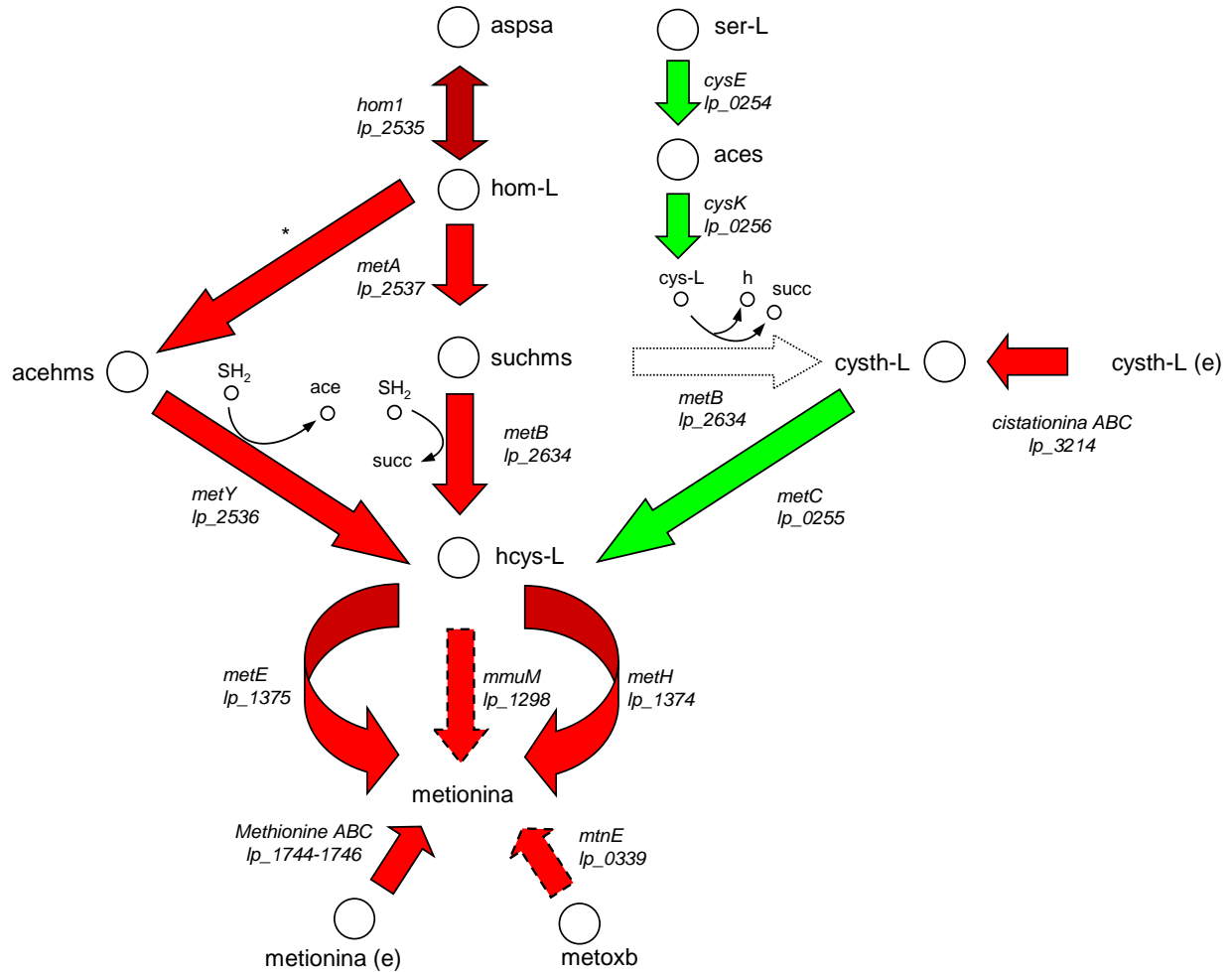
**Figura 33.** Expresión diferencial de los genes regulados por GlnR en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. Se señalan los genes que presentaron inducción (rojo) o represión (verde) en sus niveles de transcripción. Tonalidades oscuras corresponden a variaciones cercanas a 1,5-2 veces con respecto al control ( $FC > 1,5$ ;  $p < 0,05$ ;  $FDR < 0,05$ ). R: regulador transcripcional.

Adicionalmente, el análisis de micromatrices revela alteraciones en la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de la cisteína (Cys) y metionina (Met). Mientras los niveles de transcripción de genes agrupados en el operon *cysE-metC1-cysK* responsables por la biosíntesis *de novo* de Cys disminuyeron (*lp\_0254* a *lp\_0256*; 3 veces); la expresión de *mmuM*, *metH*, y *metE*, que codifican enzimas que producen directamente Met, y de *hom1*, *metB*, *metY* y *metA*, que codifican las enzimas que participan en la síntesis de su precursor L-homocisteína, aumentó entre 2 y 3,6 veces (*lp\_1298*, *lp\_1374*, *lp\_1375*, *lp\_2535* a *lp\_2537* y *lp\_2634*) (Apéndice A). De manera similar se observó la inducción de tres genes que codifican proteínas transportadoras, *lp\_1744* a *lp\_1746* (transportador ABC de L-metionina) y *lp\_3214* (posible transportador de la cistationina).

La enzima cistationina beta-liasa (MetC) también participa en la biosíntesis de este aminoácido permitiendo el paso de la cistationina a homocisteína que por acción de la metionina sintasa lleva a la producción de Met; sin embargo, dada la represión del gen *metC1*, se sugiere que las células obtienen Met por la vía del ácido aspártico más que por la ruta que involucra a la cistationina (Figura 34).

Para finalizar lo relativo al metabolismo del nitrógeno, cabe señalar que alto nivel de represión (en 4,5 veces) del gen *amtB* (proteína transportadora de amonio) en un patrón equivalente a lo observado para el ácido gálico (Tabla XIII), mientras que la transcripción del gen *lp\_2077* (transportador ABC de nitrato) se incrementó en 2,5 veces. Según se comentó anteriormente, la transcripción de *amtB* en *E. coli* se observa reprimida en condiciones de exceso de nitrógeno lo que se asocia con la necesidad de prevenir el paso del amonio al citoplasma,

donde podría combinarse con el glutamato para formar glutamina en una reacción que consume energía a expensas de un agotamiento de las reservas celulares de ATP (Conroy *et al.*, 2007) y que, como se discutirá más adelante, su regulación está bajo el control del regulón GlnR (Figura 33).



**Figura 34.** Regulación de la biosíntesis de Metionina en *L. plantarum* en presencia de ácido *p*-coumaric 1,5 mM. Las flechas rojas indican inducción de genes regulados por cajas “T-box” (contorno liso) o inducción no controlada por “T-box” (contorno discontinuo). Las flechas verdes indican represión. Las reacciones que presentan una flecha blanca están inducidas cerca de 1,5 veces pero tienen poca probabilidad de que ocurran.

4.2.2.6. RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO DERIVADO DE LA PRESENCIA DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO

El análisis del perfil transcriptómico indicó que el ácido *p*-cumárico provoca un estrés oxidativo general en *L. plantarum* WCFS1 debido a que diversos genes que participan en la respuesta al estrés tiol-específica incrementaron sus niveles de expresión de 2 a 2,7 veces, entre ellos *lp\_1253* que codifica la glutatión reductasa; *lp\_0236*, *lp\_0761* y *lp\_3437* involucrados en la síntesis de los componentes del sistema tioredoxina-tioreductasa (TrX-TrxR); tres de los cuatro genes que codifican metionina sulfóxido reductasas (*lp\_1835*, *lp\_1836* y *lp\_1979*) y una posible tiol peroxidasa (*lp\_2323*) (Tabla XVI). En el apartado anterior se ha descrito la inducción de genes que intervienen en la síntesis de metionina. Dicho aminoácido se recicla a partir de la metionina sulfóxido por la acción de la metionina sulfóxido reductasa en una reducción dependiente de la tioredoxina, lo cual se asocia con la inducción de los genes que codifican el sistema TrX-TrxR.

**Tabla XVI.** Respuesta transcriptómica de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 al estrés oxidativo derivado de la presencia del ácido *p*-cumárico a 1,5 mM.

| Gen ID         | Locus        | Descripción                          | Magnitud del cambio <sup>a</sup> | Categoría funcional principal COG <sup>b</sup>                 |
|----------------|--------------|--------------------------------------|----------------------------------|--|
| <i>lp_0236</i> | <i>trxA1</i> | tioredoxina                          | 2,06                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_0761</i> | <i>trxB1</i> | tioredoxina reductasa (NADPH)        | 2,33                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_1835</i> | <i>msrA2</i> | proteína-metionina-S-óxido reductasa | 2,12                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_1836</i> | <i>msrA3</i> | metionina sulfóxido reductasa B      | 2,10                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_1979</i> | <i>msrA4</i> | proteína-metionina-S-óxido reductasa | 2,70                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_2323</i> | <i>tpx</i>   | tiol peroxidasa                      | 2,02                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_3437</i> | <i>trxA3</i> | tioredoxina                          | 2,12                             | Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperonas |
| <i>lp_3338</i> | <i>nha2</i>  | Na(+)/H(+) antiporter                | 3,77                             | Producción y conversión de energía                             |

<sup>a</sup> Magnitud del cambio en número de veces en cultivos crecidos en medio MRS suplementado con ácido *p*-cumárico 1,5 mM en relación a cultivos sin suplementar. Ratios cuyo cambio fue >1,5 veces (tanto en incremento o disminución) fueron expresados diferencialmente con una FDR menor al 5% ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup> Clasificados por grupos funcionales de acuerdo a la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.gov/COG/](http://www.ncbi.nlm.gov/COG/)).

La metionina sulfóxido formada en este proceso, posiblemente participa en la reparación de las proteínas donde ella se localiza, así como también de otras moléculas cercanas (Luo y Levine, 2009). Las macromoléculas protegidas contra el estrés oxidativo incluirían también a lípidos de membranas (Simic, *et al.*, 2007). De esta manera, los residuos de metionina en las proteínas podrían actuar como antioxidantes catalíticos mediante el barrido de las especies reactivas (ROS) derivadas de la auto-oxidación del ácido *p*-cumárico (Luo y Levine, 2009).

Por otra parte, la transcripción del gen *lp\_3128*, que codifica una proteína de unión al ADN inducida por el estrés (regulador transcripcional), se indujo al doble de manera similar a lo observado en los estudios de los mecanismos de respuesta y adaptación al estrés inducido por la presencia de etanol en la cepa *L. plantarum* WCFS1 (van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011).

De especial interés es la marcada inducción de algunos genes que participan en el transporte de electrones en varias rutas de metabólicas. El tercer gen con el mayor incremento en sus niveles de expresión (cerca de 20 veces), cae en esta categoría y es *lp\_1425*, que codifica una de las seis copias redundantes de la enzima fumarato reductasa de *L. plantarum* WCFS1 (según Kleerebezem *et al.*, 2003). En este mismo grupo de genes, y posiblemente formando un operón, se observó que *lp\_1424* (posible FMN oxidoreductasa dependiente de NADPH) y *lp\_1426* (proteína de función desconocida) presentaron una inducción de 15,3 y 7,2 veces, respectivamente. En *Enterococcus faecalis* un gen similar a *lp\_1425*, *frdA*, codifica una flavo-proteína que contiene el sitio catalítico para la reducción del fumarato y facilita la respiración anaeróbica mediante la conversión del fumarato a succinato usando menaquinol como un donador de electrones (actividad quinol oxidasa) (van Hellemond y Tielens, 1994). Se ha descrito que FrdA tiene un efecto supresor sobre la producción de especies ROS que se derivan de procesos cíclicos de óxido-reducción de demetilmenaquinona (DMK) asociada a membrana (Huycke *et al.*, 2001). Aunque la producción de menaquinonas (MQ) no se ensayó en este estudio, se conoce que estas moléculas pueden ser sintetizadas a partir del corismato (genes *tkl2/aroD1/aroA/aroB* y *aroI/tryA/aroE/lp\_2036/aroF/lp\_2038*) (Figura 33). Las MQ y ubiquinonas (UQ) en su forma reducida funcionan como transportadores de electrones y previenen la iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos en las membranas (Soballe y Poole, 2000). En función de esto, se sugiere que la inducción de este grupo de genes puede ser una respuesta paralela a la biosíntesis de Met, que permite resistir la actividad pro-oxidante del ácido *p*-cumárico. Adicionalmente, se observó la inducción de *lp\_3125*, responsable de la síntesis de otra posible fumarato reductasa truncada en el extremo N-terminal (4 veces).

Un papel potencial para *lp\_1424* y *lp\_1425* podría ser participar vía la síntesis de menaquinonas, en el ciclo redox asociado a la membrana aún no establecido para *L. plantarum*. En este contexto se encontró que *lp\_1424* presenta similitud con algunas quinonas oxidoreductasas dependientes de NADPH de *Streptococcus pneumoniae* y *L. delbruecki*. Por último, la inducción de *lp\_1918* que codifica una quinona oxidoreductasa dependiente de NADPH suma evidencias que apoyan esta hipótesis.

#### 4.2.2.7. GENES DEL SECRETOMA

El secretoma incluye todas las proteínas secretadas o liberadas por las células al compartimiento extracelular. Se estima que el genoma de *L. plantarum* codifica 223 proteínas extracelulares que en su mayoría presentan un motivo o dominio que les permite anclarse a la superficie celular (Boekhorst *et al.*, 2006). La presencia del ácido *p*-cumárico alteró la regulación de 20 genes que codifican proteínas pertenecientes al secretoma de esta bacteria (8 genes mostraron inducción en sus niveles de expresión y 12 represión) (Apéndice A). Más de la mitad de los genes inducidos codifican precursores de lipoproteínas o lipoproteínas que hipotéticamente intervienen en el transporte de oligopéptidos (*lp\_0018*, *lp\_0201*, *lp\_1261*, *lp\_1812* y *lp\_2393*); y tres genes codifican proteínas de transmembrana: *lp\_2586* (proteína de función desconocida anclada a la pared celular), *lp\_1746* (subunidad de unión al sustrato del transportador ABC de D-metionina) y *lp\_3214* (transportador de la cistationina). Por otra parte, seis de los 12 genes cuya transcripción disminuyó codifican hidrolasas del peptidoglicano (PGH) que contienen un dominio LysM de anclaje a la pared celular (*lp\_0302*, *lp\_0304*, *lp\_3014*, *lp\_3015*, *lp\_3421* y *lp\_2845*) y un dominio que posee función enzimática asociada a la degradación de la pared bacteriana (Boekhorst *et al.*, 2006). La represión de la expresión de las PGH junto con la inhibición del gen *lp\_2810* (que codifica una posible proteína lisina) indica un menor recambio en el peptidoglicano y posible bloqueo de los mecanismos propios de lisis celular de la bacteria.

#### 4.2.2.8. INTERRUPTIÓN DEL GEN *LP\_3665* (*PDC*) EN *L. PLANTARUM*

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento derivado del análisis transcriptómico e intentar dilucidar la existencia de otras enzimas que participan en la degradación de los ácidos hidroxicinámicos, se decidió evaluar la influencia del ácido *p*-cumárico en una cepa mutante

WCFS1 $\Delta$ pad que posee una interrupción en el gen *lp\_3665* (*pdc*) y por tanto es incapaz de sintetizar la enzima PAD descarboxilasa. Adicional a la descarboxilasa de ácidos fenólicos, Barthelmebs *et al.* (2000a) describieron la posible existencia en *L. plantarum* LPNC8 de una segunda descarboxilasa, así como también de una reductasa del ácido *p*-cumárico.

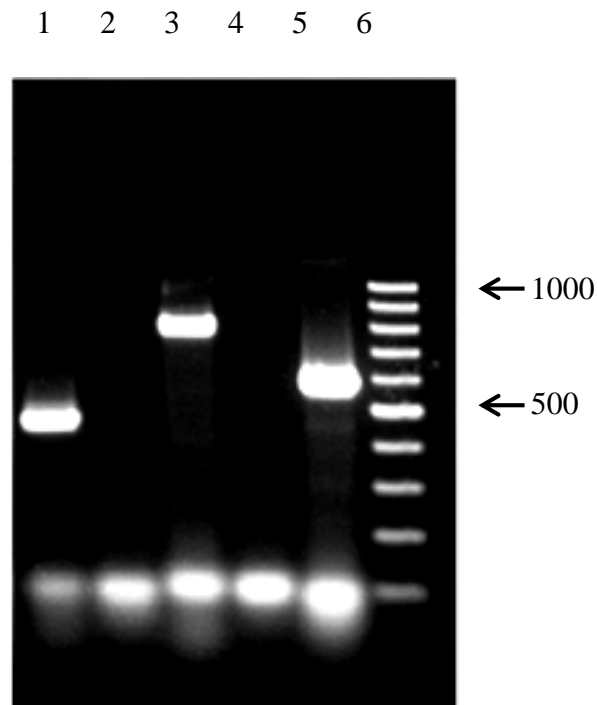
La cepa mutante WCFS1 $\Delta$ pad se obtuvo a partir de células electrocompetentes de *L. plantarum*. En el plásmido pUCE191 (Arrecubieta *et al.*, 1995) se clonó un fragmento interno de 219 pb (denominado *pad*\*) del gen *pdc* amplificado mediante los oligonucleótidos 556 y 557. Una vez obtenido el plásmido pUCE191-pad se llevó a cabo la transformación de la cepa *L. plantarum* WCFS1 según el protocolo descrito por Aukrust y Blom (1992). La recombinación homóloga que se produce entre el fragmento interno *pad*\* clonado en el plásmido y la copia del gen *pdc* presente en el cromosoma de la bacteria da origen a la interrupción del gen a través de un mecanismo de inserción-duplicación que como ya se describió lleva a la integración del plásmido pUCE191-pad en el cromosoma de la bacteria (Figura 22).

La correcta integración del plásmido se comprobó mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 1224 que hibrida en el plásmido, y 274 que hibrida en una región externa al fragmento *pad*\* en la zona inicial del gen *pad*, obteniendo un producto amplificado de 406 pb. También se incluyó la amplificación de un fragmento del gen que codifica la resistencia a eritromicina (oligonucleótidos 697 y 698 que amplifican un fragmento cercano a 800 pb), y se corroboró que el gen *pdc* completo no se amplifica debido a la incorporación de la secuencia del plásmido en el genoma de la bacteria (oligonucleótidos 274 y 275 que amplifican 537 pb) (Figura 35).

#### 4.2.2.9. INFLUENCIA DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *LP\_3665* (*PDC*) EN EL CRECIMIENTO DE *L. PLANTARUM*

Una vez confirmada la correcta inserción del plásmido pUCE191-pad con la consiguiente interrupción del gen *pdc* se procedió a evaluar el patrón de crecimiento de este mutante. La cepa silvestre “wild type” (WT) y el mutante WCFS1 $\Delta$ pad se crecieron en medio MRS líquido suplementado con ácido *p*-cumárico a una concentración de 1,5 mM. Una cepa control, WCFS1 $\Delta$ lp\_2942, llevando una mutación equivalente pero en un gen cuya deficiencia no se relaciona con el metabolismo de este ácido fenólico también se incluyó en el estudio.



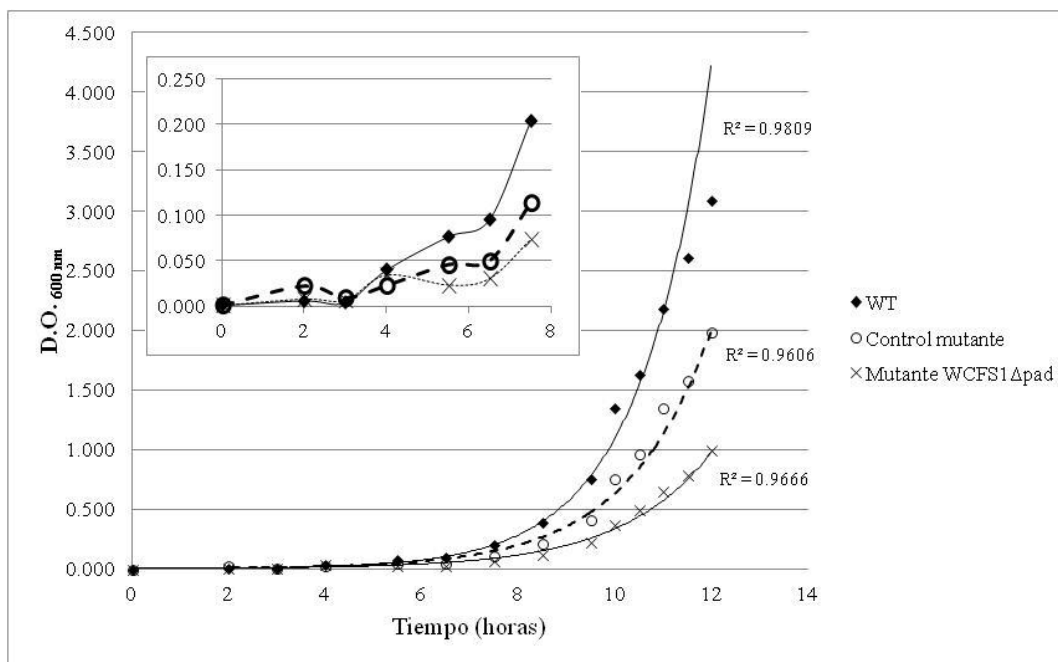


**Figura 35.** Verificación de la interrupción de gen *pdC* (*lp\_3665*) por inserción del plásmido pUCE191-pad vía recombinación homóloga en *L. plantarum* WCFS1. Fragmento “inicio gen *pdC*-plásmido pUCE191” amplificado con los oligonucleótidos 274+1224 (1); amplificación del gen completo *pdC* con 274+275 (2); amplificación de un fragmento del gen eritromicina con oligonucleótidos 697+698 (3); control negativo sin ADN con oligonucleótidos 697+698 (4); control positivo con ADN de WCFS1 y oligonucleótidos 518+519 banda de 600 pb (5); marcador guía de 100 pb (6).

La prueba se realizó sin la adición de antibiótico de forma equivalente a lo realizado para el mutante WCFS1 $\Delta$ pdC, con lo cual se garantiza que los cambios observados son reflejo de la disfuncionalidad y no de la presión selectiva del antibiótico. El ácido *p*-cumárico se añadió a las cuatro horas de haber iniciado el crecimiento ( $t=4$ ).

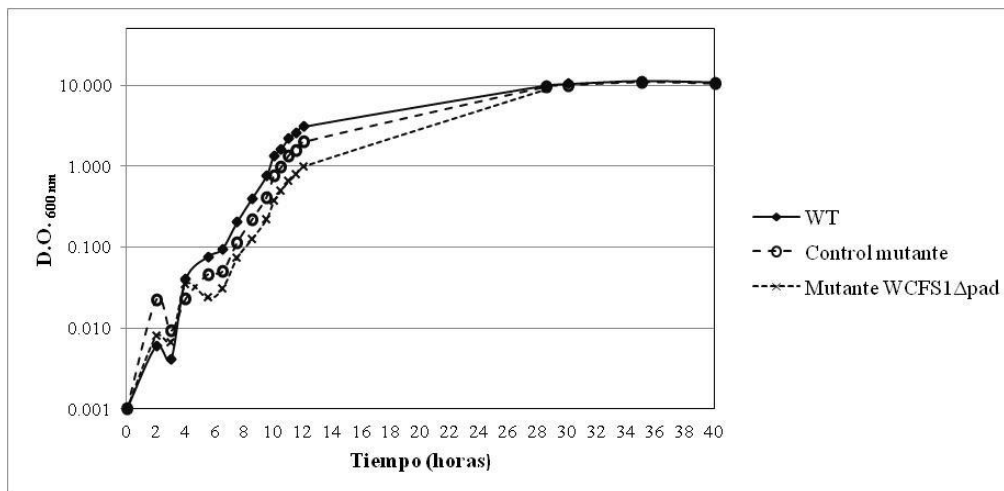
De las ecuaciones del ajuste exponencial ( $Y = M * e^{rx}$  donde, Y es el incremento de la biomasa, M es la biomasa inicial, r es la tasa de crecimiento instantáneo, x el tiempo t y  $e = 2,718281828459$ ; ver Materiales y Métodos) se determinó que la velocidad de crecimiento es levemente menor en las cepas WCFS1 $\Delta$ pad y WCFS1 $\Delta$ lp\_2942 (con pUCE191 insertado) con tasas de crecimiento de 0,57 y 0,53 unidades, respectivamente, en comparación a 0,67 unidades para la cepa WT.

En la figura 36 se observa que una vez que se añade el compuesto fenólico ( $t=4$ ), la cepa WCFS1 $\Delta$ pad, con el gen *pdc* interrumpido, presenta una disminución en los valores de  $DO_{600}$  (quizás por una leve lisis celular) y en la velocidad de crecimiento, lo que se traduce en una prolongación de la fase *lag* hasta las siete horas (detalle en el recuadro superior izquierdo,  $t=4$  a  $t=7$ ). Por su parte las cepas WT y WCFS1 $\Delta$ lp\_2942 (control de la mutación) inician su crecimiento exponencial a partir de la tercera hora ( $t=3$  a  $t=4$ ). Transcurridas cuatro horas de contacto con el ácido fenólico, la cepa mutante con el gen *pdc* interrumpido es capaz de resistir los efectos tóxicos del compuesto y supera el retraso en la velocidad de crecimiento poblacional ( $t=8$  a  $t=12$ ) hasta tal punto que los valores de  $DO_{600}$  se igualan a partir de las 24 horas (Figura 37).



**Figura 36.** Comparación mediante un ajuste de regresión exponencial del incremento en la biomasa de la cepa mutante WCFS1 $\Delta$ pad deficiente en la expresión del gen *pdc* vs. la cepa silvestre “wild type” (WT) de *L. plantarum* WCFS1 en presencia de ácido p-cumárico 1,5 mM. El aumento en la biomasa ( $OD_{600}$ ) en función del tiempo (horas) se analizó durante 14 horas cada 30 min y después cada 8 horas hasta las 40 horas. La cepa mutante deficiente en *lp\_2942* (gen no relacionado) se usó como control de la mutación. El recuadro superior insertado en la gráfica presenta una ampliación del intervalo comprendido entre  $t=0$  y  $t=8$  que permite visualizar el detalle del momento en el que se añadió el ácido ( $t=4$ ). Se aplicó un ajuste de regresión exponencial a través del cual se estableció que las diferencias no son significativas (WT:  $y = 0,0013e^{0,6757x}$ ; WCFS1 $\Delta$ pad:  $y = 0,002e^{0,5778x}$ ; WCFS1 $\Delta$ lp\_2942:  $y = 0,0016e^{0,5345x}$ ). Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

La prolongación de la fase *lag* en el mutante WCFS1 $\Delta$ pad puede ser debida a un aumento en la síntesis de proteínas de la familia Usp (en nuestro estudio, los productos de los genes *lp\_2993* y *lp\_3663*), que conduce a un estado fisiológico donde el crecimiento se lentifica de forma puntual hasta que se logra contrarrestar el estrés celular.



**Figura 37.** Efecto del ácido *p*-cumárico a 1,5 mM en el crecimiento de la cepa mutante WCFS1 $\Delta$ pad deficiente en la expresión del gen *pd*c que codifica la enzima PAD descarboxilasa vs. la cepa silvestre “wild type” (WT) de *L. plantarum* WCFS1. Las células se crecieron en medio MRS líquido. La cepa mutante deficiente en *lp\_2942* (gen no relacionado) se usó como control de la mutación. Los datos representan la media de los resultados de tres experimentos independientes.

Barthelmebs *et al.* (2000a) en sus estudios realizados con la cepa *L. plantarum* LPD1 (que también presenta el gen *pd*c no funcional) observan una disminución significativa en la velocidad de crecimiento y en la biomasa final únicamente cuando las células se cultivan en presencia de ácido *p*-cumárico a concentraciones superiores a 3 mM (una disminución en la biomasa del 22% a 3 mM y del 43% a 6 mM, al comparar con el cultivo control).

Lo observado en el mutante WCFS1 $\Delta$ pad indica que una concentración de 1,5 mM de ácido *p*-cumárico da origen a cambios que afectan de manera puntual la velocidad de crecimiento, sin embargo, la población logra contrarrestar los daños ocasionados por el compuesto después de un corto periodo de tiempo y se recupera hasta alcanzar niveles de crecimiento iguales a los del cultivo control.

El patrón de crecimiento descrito sugiere que las células de *L. plantarum* WCFS1 poseen rutas alternativas para resistir los efectos tóxicos del ácido *p*-cumárico en ausencia de la enzima PAD en un modelo eficiente y efectivo. Estas observaciones coinciden con los resultados del análisis transcriptómico donde se evidencia que la respuesta de esta cepa a la presencia del ácido hidroxicinámico es múltiple y global, e incluye mecanismos específicos (como actividad de la enzima PAD), así como también mecanismos generales (proteínas de estrés térmico, chaperonas, proteasas) y complejos (transportadores, modulación del metabolismo del nitrógeno, entre otros), que garantizan la supervivencia de la población celular.

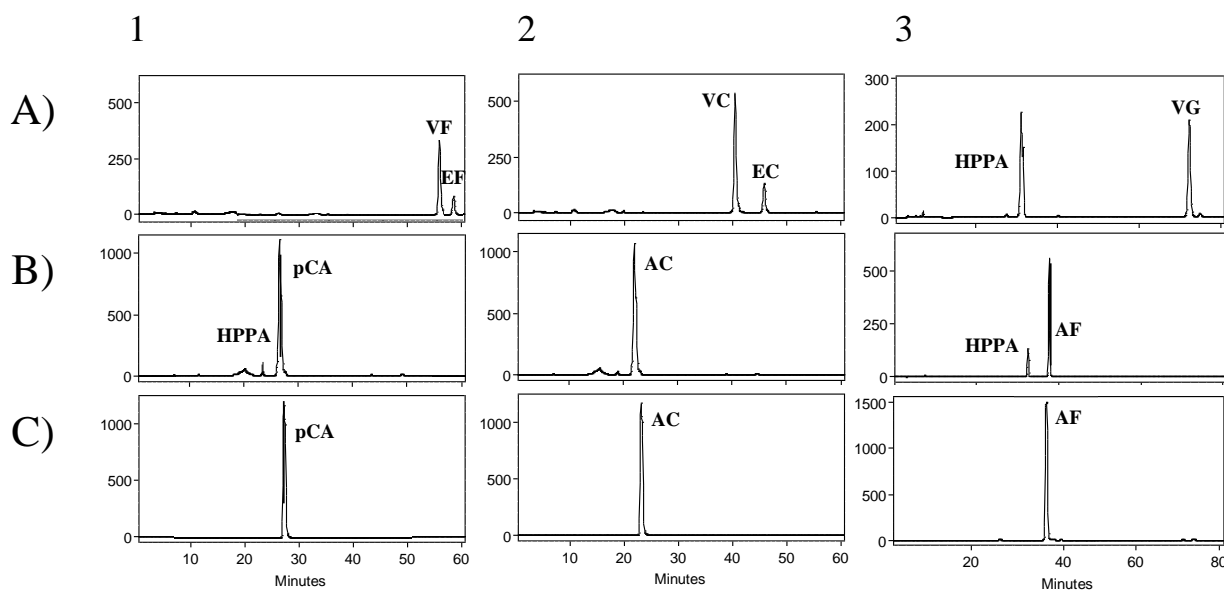
#### 4.2.2.10. INTERRUPCIÓN DEL GEN *LP\_3665* (*PDC*) Y METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS *P*-CUMÁRICO, CAFEICO, Y FERÚLICO

Considerando el patrón de crecimiento descrito para la cepa mutante WCFS1 $\Delta$ pad que posee el gen *pdc* interrumpido, se decidió evaluar mediante HPLC la degradación de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico en un ensayo equivalente a lo realizado para el estudio del metabolismo del ácido gálico. Para ello las células de la cepa silvestre (WT) y mutante WCFS1 $\Delta$ pad se cultivaron en medio RPM líquido a 30 °C en presencia del ácido fenólico a una concentración final de 1,5 mM durante 7 días. Después de la incubación, los compuestos fenólicos presentes en los sobrenadantes de los cultivos se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron por HPLC. En la figura 38 se presentan los cromatogramas obtenidos. En el cultivo de la cepa WT el ácido *p*-cumárico (pCA) se descarboxiló a 4-vinil fenol (VF) (mayoritariamente) el cual posteriormente por una reacción de reducción se transformó en 4-etil fenol (EF) (Figura 38.1.A). El perfil de degradación de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico en los cultivos de la cepa silvestre coincide con lo descrito previamente en *L. plantarum* WCFS1 por Landete *et al.* (2007) y Rodríguez *et al.* (2008a).

En la figura 38.1.B se puede observar que en el sobrenadante del medio de cultivo inoculado con el mutante WCFS1 $\Delta$ pad el ácido *p*-cumárico no se degrada y permanece en el sobrenadante del cultivo. Adicionalmente se detectó un compuesto minoritario cuyos tiempos de retención y espectro de absorción coinciden con el ácido 3-4-hidroxifenil propiónico (HPPA) o ácido florético. La aparición de HPPA junto al ácido *p*-cumárico coincide con lo descrito por Barthelmebs *et al.* (2000a) en relación a la biotransformación de los ácidos fenólicos a derivados

de los ácidos fenil propiónicos en estudios realizados con la cepa mutante LPD1 deficiente en la actividad PAD.

El perfil de degradación de los otros dos ácidos hidroxicinámicos en el mutante WCFS1 $\Delta$ pad es similar. Se observa que bajo las condiciones descritas en el cultivo de la cepa mutante las células son incapaces de transformar el ácido cafeico (AC) a vinilcatecol (VC) y etil catecol (EC) (Figura 38.2.B) y el compuesto permanece en el medio de cultivo sin metabolizar. Por último, no se observó la degradación del ácido ferúlico (AF) a 4-vinil guayacol (VG) (Figura 38.3.B) aunque sí se detectó la formación del ácido hidroferúlico (HPPA) en niveles equivalentes a lo observado en la cepa WT.



**Figura 38.** Degradación de los ácidos *p*-cumárico (1), cafeico (2) y ferúlico (3) en cultivos de *L. plantarum* WCFS1 (A); mutante WCFS1 $\Delta$ pad (B) y control del sustrato en medio RPM (C). Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 7 días en medio RPM conteniendo los tres ácidos hidroxicinámicos a 1,5 mM. Los compuestos se identificaron comparando sus tiempos de retención y espectros de absorción con el patrón. *p*-CA: ácido *p*-cumárico, AC: ácido cafeico, AF: ácido ferúlico, VF: 4-vinil fenol, VC: 4-vinil catecol, EF: 4-etil fenol, EC: 4-etil catecol, VG: vinilguayacol, HPPA: ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico o ácido florético (en 1.A), HPPA: ácido 3-(4-hidroxi-3metoxifenil) propiónico o ácido hidroferúlico (en 3.A y 3.B).

En este estudio se describe por primera vez el metabolismo de los ácidos *p*-cumárico y cafeico en ausencia de la actividad descarboxilasa de los ácidos fenólicos (mutante WCFS1 $\Delta$ pad

de *L. plantarum* WCFS1) y la formación del ácido florético a partir del ácido *p*-cumárico. Hasta la fecha, la formación de los ácidos HPPA o derivados de los ácidos propiónicos se había observado en estudios realizados con *L. plantarum* 748<sup>T</sup> durante la degradación de los ácidos ferúlico y *m*-cumárico (Rodríguez *et al.*, 2008a) y con el mutante LPD1 de *L. plantarum* LPNC8 que posee el gen *pd*c no funcional (Barthelmebs *et al.*, 2000a) cuando las células se cultivaban en presencia de ácido ferúlico.

La existencia de enzimas reductasas se ha sugerido en dos reacciones del metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos: una primera reductasa transforma los vinil derivados en etil derivados, mientras que otra actividad reductasa reduce directamente el ácido fenólico y origina la formación de ácidos HPPA (Barthelmebs *et al.*, 2000a; Rodríguez *et al.*, 2008a; Rodríguez *et al.*, 2008b). La reducción de los ácidos fenólicos vía la producción de derivados de los ácidos propiónicos es un mecanismo poco eficiente y hasta la fecha se desconoce su implicación biológica (Barthelmebs *et al.*, 2000a).

Los resultados aquí descritos difieren de los descritos por Cavin *et al.* (1997) y Barthelmebs *et al.* (2000a) respecto a la existencia de una segunda enzima con actividad descarboxilasa (PDC2) con mayor afinidad por el ácido ferúlico, que en ausencia de la PAD descarboxilasa (por la interrupción del gen *pd*c en el mutante LPDC1), también transforma los ácidos *p*-cumárico y ferúlico a 4-vinil fenol y 4-vinil guayacol, respectivamente. Las discrepancias observadas entre dichos resultados y los obtenidos en esta tesis pueden deberse a que para el análisis de los metabolitos se ha utilizado el perfil cromatográfico por HPLC, técnica más sensible, donde la detección de la presencia de un compuesto se logra con mayor especificidad ya que se combinan los tiempos de retención con los perfiles de máxima absorbancia en el rango de luz UV.

Los análisis por HPLC confirman que *L. plantarum* WCFS1 posee una única enzima PAD responsable de la descarboxilación no oxidativa de los ácidos hidroxicinámicos. Por otra parte, considerando las posibles rutas metabólicas alternativas a la presencia de la PAD, la desintoxicación celular vía la participación de una enzima reductasa, que origina la síntesis de los ácidos HPPA, es un mecanismo poco eficaz que tan solo ocasiona la transformación parcial de los ácidos hidroxicinámicos, al menos en las condiciones ensayadas en este estudio. Es posible que esta actividad reductasa adquiera significancia apreciable cuando la bacteria se encuentren en un hábitat que contiene cantidades elevadas de estos ácidos fenólicos (cerca de las concentraciones mínimas inhibitorias) y en condiciones reductoras o ambientes anaeróbicos. La

identificación del gen y la purificación de la enzima responsable de esta biotransformación, así como también los estudios de su afinidad respecto los diferentes ácidos hidroxicinámicos, son temas pendientes para caracterizar en profundidad esta actividad.

Los resultados de este apartado en conjunto con los estudios de crecimiento en el mutante WCFS1 $\Delta$ pad demuestran que *L. plantarum* WCFS1 en ausencia de la actividad PAD utiliza mecanismos alternativos a la degradación del ácido *p*-cumárico para adaptarse y resistir las alteraciones que se dan en las células del cultivo por la acción pro-oxidante de este compuesto.

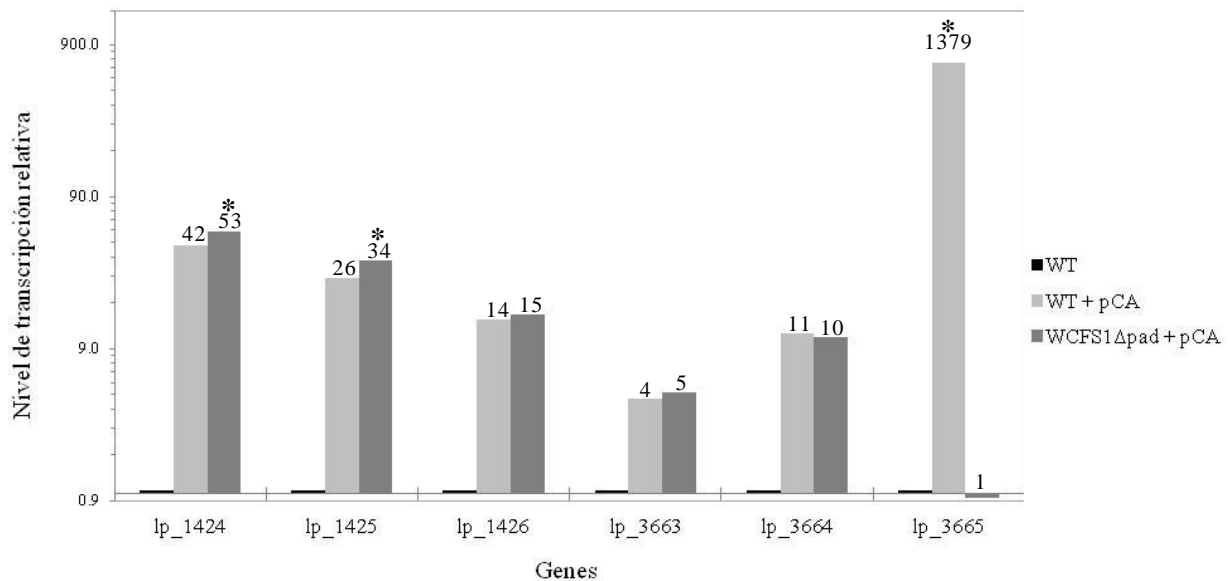
#### 4.2.2.11. INFLUENCIA DE LA INTERRUPCIÓN DEL GEN *LP\_3665* (*PDC*) EN EL PATRÓN DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS PRINCIPALES GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN PRESENCIA DEL ÁCIDO *P*-CUMÁRICO

Se ha demostrado que en ausencia de la actividad PAD descarboxilasa los ácidos fenólicos permanecen en el medio donde se desarrolla la cepa WCFS1 $\Delta$ pad que presenta el gen *pdc* interrumpido y es posible que la población celular consiga resistir la presencia de dichos ácidos a través de un ajuste metabólico específico y/o global. Los cambios globales sólo se pueden evaluar realizando un análisis transcriptómico con el ARN de WCFS1 $\Delta$ pad; sin embargo, algunos cambios específicos en genes puntuales, se pueden analizar mediante RT-qPCR.

En función de esto, se decidió analizar las variaciones en la expresión de los genes *lp\_3663* (gen *usp1*) y *lp\_3664* (gen *padR*) asociados a los eventos de regulación, así como también de *lp\_1424*, *lp\_1425* y *lp\_1426*, grupo de genes en los cuales se observó la segunda más alta inducción en su expresión. El gen *lp\_3665* (*pdc*) participa en la respuesta principal de transformación del ácido *p*-cumárico y en este estudio se ha sugerido que los genes *lp\_1424* a *lp\_1426* pueden desempeñar un papel secundario en la respuesta para hacer frente al efecto pro-oxidante del ácido *p*-cumárico.

Se extrajo el ARN de las células cultivadas en presencia del ácido *p*-cumárico a 1,5 mM y se utilizó para sintetizar el ADNc mediante la enzima retrotranscriptasa (ver detalles en Materiales y Métodos). La cuantificación relativa del nivel de expresión de cada gen se realizó en un ensayo de RT-qPCR empleando los oligonucleótidos descritos en la tabla V, normalizando los datos en relación a la expresión del gen *ldhD* (*lp\_2057*; control endógeno; ver Materiales y Métodos).

Los resultados demuestran que ninguno de los genes estudiados presenta una variación marcada en su nivel de transcripción cuando el gen *lp\_3665* (*pdc*) no está funcional (Figura 39).



**Figura 39.** Nivel relativo de transcripción de los genes *lp\_1424*, *lp\_1425*, *lp\_1426*, *lp\_3663* (posible *usp1*), *lp\_3664* (*padR*) y *lp\_3665* (*pdc*) en la cepa mutante WCFS1Δ*pad* con el gen *lp\_3665* interrumpido en presencia de ácido *p*-cumárico 1,5 mM. WT: *L. plantarum* WCFS1 sin inducir (cultivo control); WT + pCA: *L. plantarum* WCFS1 inducido con ácido *p*-cumárico 1,5 mM durante 10 min; WCFS1Δ*pad* + pCA: cepa mutante de *L. plantarum* WCFS1 con el gen *lp\_3665* interrumpido inducida en idénticas condiciones a la cepa WT. \*:diferencias significativas ( $p > 0,2$ ).

Los niveles de expresión de los genes *lp\_3663* y *lp\_3664* son similares a los observados por Licandro-Seraut *et al.* (2008) en estudios realizados en la cepa *L. plantarum* NC8 los cuales demuestran que el gen *padR* es el represor de la expresión de *pdc*, actúa como un regulador transcripcional negativo y puede estar formando un operón con *lp\_3663* (*usp1*). Sin embargo, los valores absolutos del nivel de expresión de los genes *lp\_1424* y *lp\_1425* se incrementaron de 42 a 53 veces y de 26 a 34 veces, respectivamente, y a pesar de que tales diferencias son diferentes a un nivel de significancia inferior ( $p > 0,2$ ), se decidió considerarlas teniendo en cuenta que la metodología de RT-qPCR es muy sensible y cambios de 8-10 veces en el nivel de expresión no se deben desestimar.

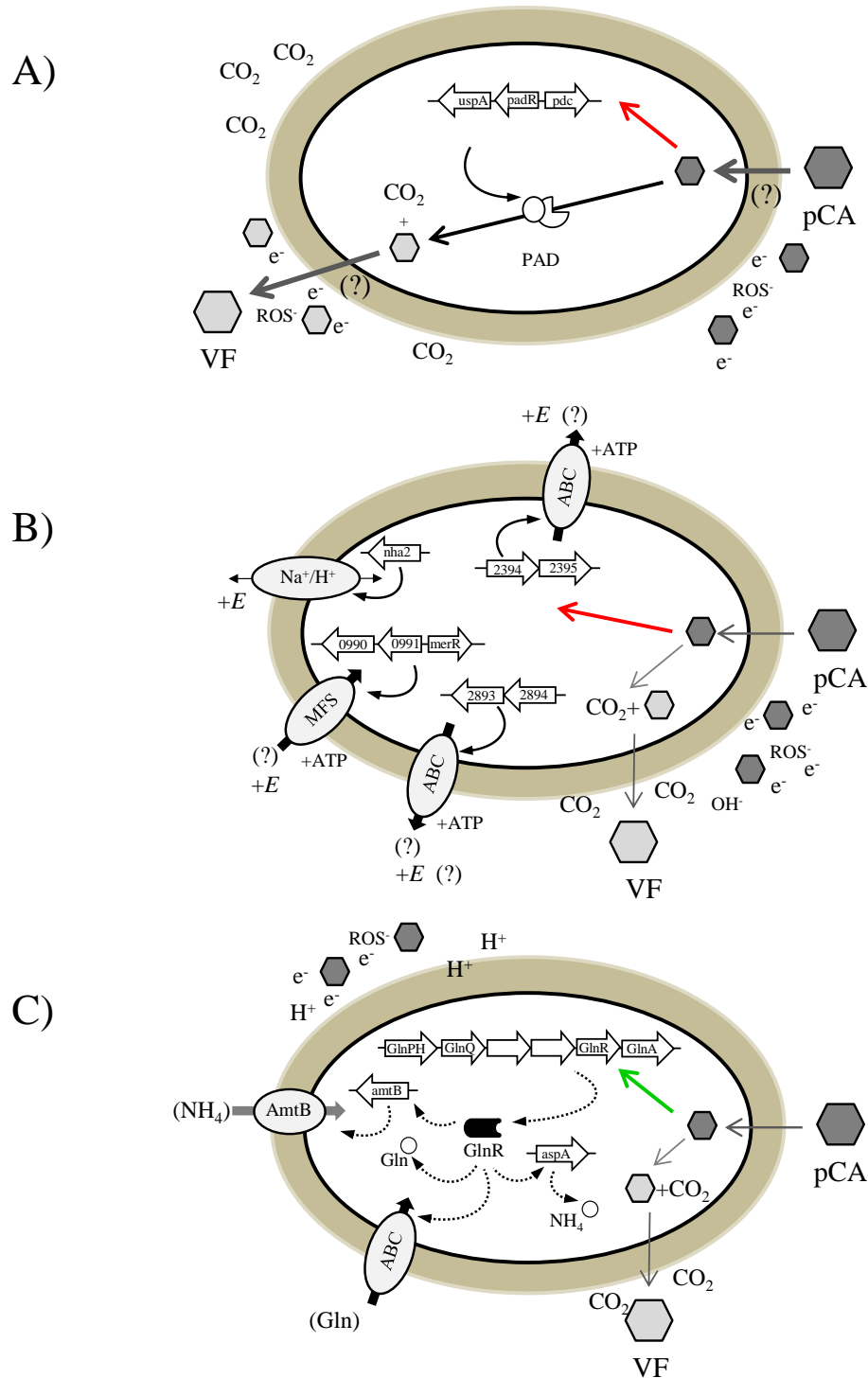
Se ha comentado que los genes *lp\_1424* y *lp\_1425* pueden tener una posible función durante las reacciones de óxido-reducción que ocurren en presencia del ácido *p*-cumárico (ver



pto. 4.2.2.6) y donde compuestos intermediarios como las menaquinonas (MQ) o ubiquinonas (UQ) pueden estar actuando como moléculas transportadoras de electrones para prevenir que se inicie o propague la peroxidación de lípidos en la membrana (Huycke *et al.*, 2001; Reverón *et al.*, 2012). El aumento en los niveles de transcripción de estos genes en los cultivos correspondientes al mutante WCFS1 $\Delta$ pad refleja un incremento en el nivel de estrés oxidativo por la acumulación del ácido fenólico en el medio. Adicionalmente, en ausencia de la actividad PAD descarboxilasa, tampoco se produce el CO<sub>2</sub> que garantiza a las células un ambiente reductor en el que las reacciones de destoxificación alternativas ocurran óptimamente. Esto, finalmente se traduce en una mayor demanda de ciclos de óxido-reducción de demetilmenaquinona (DMK) asociada a la membrana, que se ha relacionado con el incremento de la expresión de estos genes. Sin embargo, la información que se dispone sobre la función de *lp\_1424* y *lp\_1425* es limitada, por lo que estudios posteriores podrían dilucidar su actividad y los mecanismos de adaptación en los que participan.

En la figura 40 se hace una representación esquemática de los posibles mecanismos de tolerancia y adaptación que utiliza *L. plantarum* frente al ácido *p*-cumárico. Una revisión completa del patrón de expresión génica observado indica que la descarboxilación mediada por la enzima PAD descarboxilasa es muy eficaz y constituye la respuesta principal de destoxificación.

Sin embargo, el estrés oxidativo en presencia de este compuesto es muy elevado por lo que la células despliegan mecanismos de tolerancia alternativos que incluyen: i) cambios en los genes que codifican proteínas asociadas al secretoma, ii) la activación de transportadores tipo ABC y multidrogas, iii) la inducción de la biosíntesis del corismato, iv) la activación de chaperonas y proteasas, v) la activación de la vía cíclica de óxido-reducción de la metilmenaquinona, y v) la activación de los genes que codifican la metionina sulfóxido reductasa y el sistema tioredoxina-tioreductasa que recicla la metionina facilitando el barrido de las especies ROS. Mientras estos mecanismos logran los ajustes requeridos, las células pasan a un estado de ahorro de energía inhibiendo la síntesis de purinas y pirimidinas, disminuyendo los procesos de transcripción y traducción, limitando el transporte de azúcares y del amonio al interior de la célula y aumentando los procesos de producción y conversión de energía a partir de fuentes de carbono diferentes a la glucosa por la vía del malato.



**Figura 40.** Representación esquemática de los posibles mecanismos de tolerancia y adaptación asociados a la respuesta de *L. plantarum* WCFS1 en presencia del ácido p-cumárico. Descarboxilación no oxidativa (A); síntesis de transportadores (B) e inhibición la síntesis de glutamina y del transporte de amonio (C). pCA: ácido p-cumárico; VF: vinil fenol; +E: consumo de energía; +ATP: consumo de ATP. Las flechas roja (inducción), verde (represión), negra continua (activación) y negra discontinua (inhibición) se refiere a la expresión de los genes o a la síntesis de las proteínas codificadas por cada gen.

#### 4.2.2.12. REDES DE REGULACIÓN Y SU PARTICIPACIÓN EN LA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS INDUCIDO POR LA PRESENCIA DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO EN *L. PLANTARUM*

Muchos de los genes de *L. plantarum* WCFS1 implicados en la respuesta al estrés producido por el ácido *p*-cumárico posiblemente se transcriben en conjunto gracias a su agrupación en operones (Tablas XII y XIII). A su vez, los eventos de transcripción pueden estar controlados por la presencia de proteínas reguladoras que actúan simultáneamente en varios operones dando lugar a los regulones.

La activación de varios regulones frente a un estímulo origina complejas redes de regulación que controlan la expresión génica global y le permiten a las células adaptarse rápidamente a los cambios de su entorno (Alkema *et al.*, 2004). El descubrimiento de las redes de regulación involucradas en estas adaptaciones es uno de los grandes retos de la biología molecular actual. El análisis de la expresión génica mediante el uso de micromatrices de ADNc proporcionó una fotografía instantánea del perfil transcripcional de las células de *L. plantarum* en las condiciones evaluadas y la información obtenida se puede asociar a diversas redes de regulación descritas en otras bacterias.

**4.2.2.12.1. Regulones CtsR y HcrA:** Entre los mecanismos de co-regulación bien documentados tanto en bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*) (Yura *et al.*, 2000) como Gram-positivas (*Bacillus subtilis*) (Schumann, 2003) se encuentra el de los genes de choque térmico clase I. Estos genes presentan una secuencia operadora muy conservada denominada CIRCE (controlling inverted repeat of chaperone expression, por sus siglas en inglés) que es el sitio de unión para el represor HcrA. Inicialmente los genes implicados en esta regulación se asociaron a la respuesta provocada por aumentos en la temperatura, sin embargo cada día se recopilan nuevos datos que indican que se trata de un mecanismo de respuesta universal al estrés general.


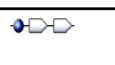

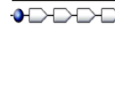




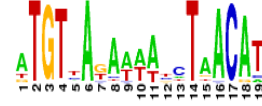


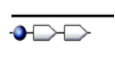

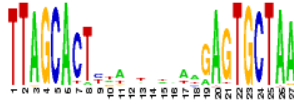
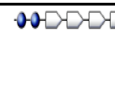




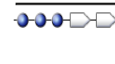


En *Bacillus subtilis*, la respuesta al choque térmico es amplia y comprende al menos seis clases diferentes de genes cuya expresión se induce al aumentar la temperatura. La respuesta de *L. plantarum* WCFS1 frente a la presencia del ácido *p*-cumárico incluye la inducción de los genes que codifican los reguladores transcripcionales CtsR y HcrA que actúan principalmente sobre los genes clase I (chaperonas moleculares) y clase III (proteasas) (punto 4.2.2.3.).

Los genes clase III están sujetos a control transcripcional por el represor CtsR el cual se une a la secuencia repetida 5'RGTCADN NAN RGTCADN 3' (Derré *et al.*, 1999). El regulón CstR se caracterizó recientemente en *L. plantarum* mediante ensayos de unión al ADN (“DNA-binding”) (Fiocco *et al.*, 2009; Fiocco *et al.*, 2010) y en estudios *in silico* (Wels *et al.*, 2006; Wels *et al.*, 2011). Los resultados de estos estudios presentan diferencias en los genes que se describen como propios del regulón y en las secuencias consenso de unión (“binding motif”) propuestas para la proteína CtsR.

En el perfil de transcripción que presenta *L. plantarum* WCFS1 en respuesta al estrés producido por el ácido *p*-cumárico se observa la inducción de la expresión de todos los genes relacionados con el regulón CstR: *ctsR* (*lp\_1018*), *clpC* (*lp\_1019*, formando operón con *ctsR*), *clpE* (*lp\_1269*), *hrcA* (*lp\_2029*) y los genes que están bajo su control, *clpP* (*lp\_0786*), *clpB* (*lp\_1903*), *hsp1* (*lp\_0129*) y *ftsH* (*lp\_0547*), éste último descrito recientemente como miembro de este regulón (Tabla XVII). En función del resultado del análisis de las secuencias de los nucleótidos que se sitúan “upstream” del codón de iniciación ATG de cada uno de estos genes (Figura 41), en este estudio se propone redefinir el motivo *cis*-regulador para CtsR a RGTCAR-4N-RGTCAR (R: A, G). Este motivo se validó empleando el programa Virtual Footprint PRODORIC confirmándose que todos los genes relacionados con *ctsR* que se han inducido en presencia de este p están incluidos en el regulón CtsR.

En bacterias Gram-positivas, CtsR regula principalmente la expresión de genes que codifican proteasas Clp dependientes de ATP. Sin embargo en algunas especies incorpora otros operones y proteínas como por ejemplo en el caso de *Staphylococcus aureus* que comprende los operones *dnaK* y *groESL* (Chastanet *et al.*, 2003) y en *Oenococcus oeni* que incluso incluye un gen que codifica proteínas HSP de pequeño tamaño (Grandvalet *et al.*, 2005). Según se ha comentado y coincidiendo con lo descrito en estudios previos (Fiocco *et al.*, 2010; Wels *et al.*, 2010), el regulón CtsR en *L. plantarum* también comprende el operón *dnaJ* (que incluye las chaperonas DnaJ, DnaK, GrpE y al regulador HrcA), el gen *ftsH* (que codifica una posible metalo-proteasa asociada a membrana y dependiente de ATP y Zn<sup>2+</sup>) y el gen *hsp1* (proteína de choque térmico).

**Tabla XVII.** Genes co-regulados en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en respuesta al ácido *p*-cumárico.

| Logotipo de la secuencia <sup>a</sup>  | Motivo (secuencia consenso <sup>b</sup> ) | Regulón  | Operones regulados   | Genes de respuestas <sup>c</sup>                                     |
|--|---|--|--|--|
|     | RGTCAR-4N-RGTCAR                          | CtsR<br>( <i>lp_1018</i> )                         |    | <i>lp_1018</i><br><i>lp_1019</i>                                     |
|  |   |  |    | <i>lp_1269</i>   |
|  |   |  |    | <i>lp_2029</i><br><i>lp_2028</i><br><i>lp_2027</i><br><i>lp_2026</i> |
|  |   |  |    | <i>lp_0786</i>   |
|  |   |  |    | <i>lp_1903</i>   |
|  |   |  |    | <i>lp_0129</i>   |
|  |   |  |    | <i>lp_0547</i>   |
|  |   |  |    | RTGKAKA-4N-MTAACAT   |
|    | <i>lp_0802</i><br><i>lp_0803</i>          |  |  |  |
|   | <i>lp_0349</i>                            |  |  |  |
|  | <i>lp_1580</i><br><i>lp_1581</i>          |  |  |  |
|  | <i>lp_0727</i><br><i>lp_0728</i>          |  |  |  |
|   | TTAGCACTC-9N-GAGTGCTAA                    | CIRCE, elemento cis- de HcrA<br>( <i>lp_2029</i> ) |  | <i>lp_2029</i><br><i>lp_2028</i><br><i>lp_2027</i><br><i>lp_2026</i> |
|  |   |  |  | <i>lp_0129</i>   |
|  |   |  |  | <i>lp_2729</i>   |
|  |   |  |  | <i>lp_3269</i>   |
|   | AAAMACGAAC<br>RTT                         | purR<br>( <i>lp_0466</i> )                         |  | <i>lp_3270</i><br><i>lp_3271</i>                                     |
|  |   |  |  | <i>lp_0848</i>   |
|  |   |  |  | <i>lp_0466</i><br><i>lp_0467</i>                                     |

<sup>a</sup> Logo de la secuencia. Representación gráfica de la matriz de peso /posición (PWM por su siglas en inglés). La altura en una posición representa la información contenida en una cierta posición, mientras que el tamaño de una letra representa el peso individual de una base en esa posición. Fuente: <http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/regulon.jsp> y Groot Kormelink *et al.*, 2012

<sup>b</sup> Secuencia ubicada “up-stream” del codón de iniciación de la transcripción resultante del alineamiento de los genes

<sup>c</sup> Genes que responden a la presencia del ácido *p*-cumárico que forman parte del operón ubicado “corriente abajo” del sitio de unión del elemento regulador



**Figura 41.** Identificación y alineamiento de las secuencias consenso o zonas de unión (“binding sites”) de CtsR. Los nucleótidos que coinciden con la secuencia consenso RGTCAR-4N-RGTCAR (R: A, G) se presentan sombreados. Los números de acceso a la base de datos del GenBank para cada uno de los genes de *L. plantarum* WCFS1 incluidos en este estudio son como sigue: *ctsR* (YP\_004888948); *clpC* (YP\_004888949); *ftsH* (YP\_004888549.1); *clpB* (YP\_004889680.1); *hsp1* (YP\_004888196.1); *clpE* (YP\_004889161.1); *clpP* (YP\_004888760.1); *hrcA* (YP\_004889789.1).

De manera similar a CtsR, todos los genes que se ha descrito que son regulados por HrcA alteraron sus niveles de expresión en respuesta al estrés producido por el ácido *p*-cumárico, entre ellos *groES* (*lp\_0727*), *groEL* (*lp\_0728*, formando operón con *groES*), *hrcA* (*lp\_2029*), *grpE* (*lp\_2028*), *dnaK* (*lp\_2027*), *dnaJ* (*lp\_2026*) (éstos 3 últimos formando un operón con *hrcA*), y

*hsp1* (*lp\_0129*) (Tabla XVII). Los resultados del análisis de las secuencias de nucleótidos que se sitúan “upstream” del codón de iniciación ATG del primer gen de cada operón (datos no presentados) validan el sitio de unión TTAGCACTC-9N-GAGTGCTAA y coinciden con la arquitectura definida para el regulón HrcA (Derré *et al.* 1999; Wels *et al.*, 2006).

Por último, el gen *lp\_0726* (que codifica una supuesta proteasa CaaX reanotada como una carboxilesterasa; Siezen *et al.*, 2012) cuya regulación se ha propuesto que está bajo HcrA no se expresó diferencialmente en este estudio.

Este patrón de regulación constituye un modelo de regulación dual donde ambos reguladores, CtsR y HrcA, actúan juntos y logran una sinergia en el mantenimiento de los niveles de expresión de los operones *dnaJ* y *groES* (Chastanet *et al.*, 2003).

**4.2.2.12.2. Regulón GlnR:** La reconfiguración del metabolismo del nitrógeno observada en respuesta al estrés inducido por el ácido *p*-cumárico sugiere la implicación de proteínas de unión al ADN en el control de esta respuesta tan específica. CodY y TnrA son los dos reguladores principales del metabolismo del nitrógeno en muchos *Firmicutes*, sin embargo en el genoma de *L. plantarum* los genes que codifican estas proteínas no están presentes (Kleerebezem *et al.*, 2003) por lo que el control se realiza a través de GlnR que generalmente asume las funciones globales llevadas a cabo por estos dos reguladores en otras bacterias Gram-positivas (Sonenshein, 2007).

El regulón GlnR y los genes que están bajo su control se ha descrito recientemente para la clase Bacilli (Groot Kormelink *et al.*, 2012). En este estudio se modificó la expresión de los genes *glnR* (*lp\_1580*) y *glnA* (*lp\_1581*) tanto en presencia del ácido *p*-cumárico (1,5mM) como del ácido gálico (15mM). Estos genes forman el operón *glnRA* que se autoregula negativamente por el propio GlnR. Adicionalmente se observó la represión de otro grupo de genes que están bajo el control de este regulador transcripcional e incluye a *glnPH1* (*lp\_0802*), *glnQ1* (*lp\_0803*), *aspA* (*lp\_2830*) y *amtB* (*lp\_0349*) (Figura 33). Los resultados del análisis de las secuencias de los nucleótidos situados “upstream” del codón de iniciación de cada uno de los primeros genes de cada operón (datos no presentados) coinciden con la arquitectura propuesta para el regulón GlnR según los estudios *in silico* realizados por Groot Kormelink *et al.* (2012). Sin embargo, en este estudio se definió el motivo *cis*-regulador RTGTKAKA-4N-MTAACAT (R: A,G; K: G, T y M: A, C) que también incluye al gen *aspA* (Tabla XVII).

La composición del regulón GlnR es relativamente invariable entre las bacterias Gram-positivas que forman parte de los géneros *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Oenococcus* y *Streptococcus* (Larsen *et al.*, 2006; Gunka y Commichau, 2012; Groot Kormelink *et al.*, 2012) y su función se asocia principalmente con la regulación de la incorporación del amonio en el metabolismo central del nitrógeno vía la síntesis de glutamina (operón *glnRA*) o con el transporte de amonio (*amtB-glnK*) y de glutamina/glutamato (vía *glnQ*, *glnPH*). Al mismo tiempo, observaciones en la respuesta de otros genes permiten formular asociaciones menos conservadas que apuntan a que GlnR cumple un papel más amplio. Se ha descrito que estas asociaciones incluyen a los genes *ansA* (metabolismo de asparagina), *arcA* (metabolismo de arginina), *aspA* (síntesis de aspartato), *ureaABC*, *puc* (síntesis y transporte de purinas), entre otros (Groot Kormelink *et al.*, 2012).

En este orden de ideas, los resultados obtenidos relacionados con la expresión de los operones *ansA-ansS* y *pucR-pucK* apoyan la hipótesis de la existencia de un mecanismo de co-regulación donde GlnR desempeña una función más amplia que une las rutas de respuesta al estrés ácido con las de consumo eficiente de energía logrando un control muy fino que limitaría el reciclado inútil del amonio vía su difusión fuera de la célula.

**4.2.2.12.3. Regulones PurR y PyrR:** En este estudio se observó la regulación diferencial de una buena parte de los genes involucrados en la síntesis y transporte de purinas y pirimidinas, que están bajo la modulación de los regulones PurR y PyrR respectivamente.

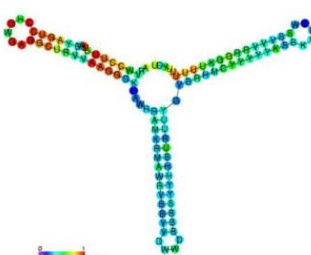











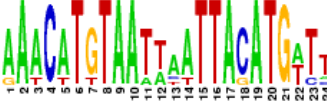






Del regulón PurR de *L. plantarum* se observó la represión de los genes involucrados en las fases finales de la síntesis de GMP y AMP a partir de la conversión de IMP: *purB* (*lp\_3269*), *purA* (*lp\_3270*), *guaC* (*lp\_3271* formando un operón con *purA*); y del transporte de xantina y uracilo: *pucK* (*lp\_2710*) y *lp\_2712*. En función del resultado del análisis de las secuencias de los nucleótidos que se sitúan “upstream” del codón de iniciación de cada uno de los genes que están delante en cada operón se definió la secuencia consenso AAAMACGAACRTT (M: A, C; R: A,G) que coincide con el motivo de unión al ADN propuesto para este regulón en esta bacteria (<http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/regulon.jsp>) (Tabla XVIII).

De manera similar se observó la represión de la mayoría de los genes descritos en el regulón PyrR que regula la síntesis de pirimidinas en respuesta a la disponibilidad de carbón inorgánico y que posiblemente forme un regulón con *pyrAA<sub>2</sub>* (*lp\_1783*). Entre ellos *pyrR*



(*lp\_2704*, también definido como *pyrR<sub>1</sub>*), *pyrP* (*lp\_2371*), *pyrAA* (*lp\_2701*), *carB* (*lp\_2700*), *pyrD* (*lp\_2699*), *pyrF* (*lp\_2698*), *pyrE* (*lp\_2697*) y *pyrR<sub>2</sub>* (*lp\_1782*).

**Tabla XVIII.** Genes co-regulados en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en respuesta al ácido *p*-cumárico.

| Logotipo de la secuencia <sup>a</sup>   | Motivo (secuencia consenso <sup>b</sup> )  | Regulón                                 | Operones regulados   | Genes de respuestas <sup>c</sup>  |
|---|--|---|--|---|
|  <p>Elemento regulador del ARN</p> | CAGTTCCTTTAA<br>ATT...   | <p><i>pyrR</i><br/>(<i>lp_2704</i>)</p> |    | <i>lp_2371</i> <i>lp_2371</i> <sup>d</sup>  |
|   | AAGCACCTTTAA<br>CTT...   |   |    | <i>lp_2704</i> <i>lp_2704</i> <sup>d</sup>  |
| TAAAACCATTTA<br>ATT...  |    |   | <i>lp_2703</i>   |   |
|   |    |   | <i>lp_2702</i>   |   |
|   |    |   | <i>lp_2701</i> <i>lp_2701</i>  |   |
|   |    |   | <i>lp_2700</i> <i>lp_2700</i>  |   |
|   |    |   | <i>lp_2699</i> <i>lp_2699</i>  |   |
|   |   |   | <i>lp_2698</i> <i>lp_2698</i>  |   |
|   |  |   | <i>lp_2697</i> <i>lp_2697</i> <sup>d</sup>   |   |
|   | CGTCCTTTAATCC<br>GG...   |   |  |  |
|   |  |   |  | <i>lp_1783</i>  |
|                                  | AAWCATGT<br>AATWWATT<br>ACATGWTT   | <p><i>padR</i><br/>(<i>lp_3664</i>)</p> |  | <i>lp_3665</i> <i>lp_3665</i>   |
|   |  |   |  | <i>lp_3664</i> <i>lp_3664</i>   |
| Sin describir   | M CTTTTTTT W D<br>M  | <p><i>pucR</i><br/>(<i>lp_2708</i>)</p> |  | <i>lp_2708</i> <i>lp_2708</i>   |
|   |  |   |  | <i>lp_2710</i> <i>lp_2710</i>   |
|   |  |   |  | <i>lp_2712</i> <i>lp_2712</i>   |
|   |  |   |  | <i>lp_3334</i> <i>lp_3334</i>   |

<sup>a</sup> Logo de la secuencia. Representación gráfica de la matriz de peso /posición (PWM por su siglas en inglés). La altura en una posición representa la información contenida en una cierta posición, mientras que el tamaño de una letra representa el peso individual de una base en esa posición. Fuente: <http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/regulon.jsp> y Groot Kormelink *et al.*, 2012

<sup>b</sup> Secuencia ubicada “up-stream” del codón de iniciación de la transcripción, resultante del alineamiento de los genes

<sup>c</sup> Genes que responden a la presencia del ácido *p*-cumárico que forman parte del operón ubicado “corriente abajo” del sitio de unión del elemento regulador con  $p < 0,05$

<sup>d</sup> Nivel de significancia  $p < 0,10$

M = A o C; S = G o T; R = G o A; Y = C o T; D = A, G o T; H = A, C o T; y N = G, A, C o T.

Se ha descrito que la expresión de *pyrAA* y *carAB* está regulada a nivel transcripcional por la disponibilidad de pirimidinas y arginina, respectivamente, en un modelo de regulación “feedback negativa” donde el producto final inhibe el primer paso de la ruta de biosíntesis

(Nicoloff *et al.*, 2000). Sin embargo, los cambios observados en este estudio en el nivel de transcripción de estos genes no se asocian a un aumento en la disponibilidad de UMP o arginina.

Los genes *pyrAA* y *carAB* codifican las enzimas carbamoil fosfato sintasas CPS-P y CPS-A, respectivamente, y ambas catalizan la producción de carbamoil fosfato a partir de glutamina y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) en una reacción que consume dos moléculas de ATP (Nicoloff *et al.*, 2005; Arsène-Ploetze *et al.*, 2006). En función de esto, de manera alternativa se sugiere que la represión incipiente de la síntesis de pirimidinas podría ser un reflejo de la carencia de glutamina y de la necesidad de evitar el consumo de ATP, más que una respuesta asociada a una regulación dependiente de la disponibilidad de Arg o pirimidinas. Esta respuesta contribuye a superar el desequilibrio celular que se deriva de la presencia del ácido *p*-cumárico y puede tener un carácter transitorio o puntual.

En cuanto a PurR, éste se autoregula de forma directa y controla completamente el transporte, la biosíntesis y rescate de las bases de purinas (Cho *et al.*, 2011; Lobanov *et al.*, 2011) aunque también podría participar en el control de la interconversión del metabolismo de purinas y pirimidinas, de manera similar a como se ha descrito para *E. coli* (Cho *et al.*, 2011). Se propone que PucR actuar como un regulador del transporte de xantina (biosíntesis de purinas) y uracilo (biosíntesis de pirimidinas) y su expresión puede estar condicionada por PurR y PyrR, en una red de co-regulación que conduce a una rápida recuperación de las actividades fisiológicas celulares.

**4.2.2.12.4. Regulón padR:** En los apartados anteriores se ha comentado que la elevada inducción del gen *pdc* es la respuesta central para hacer frente al estrés que produce la presencia del ácido *p*-cumárico y que el producto del gen *padR* controla su activación (Licandro-Seraut *et al.*, 2008). El sitio de unión de PadR al promotor de *padC* de *Bacillus subtilis* se estudió mediante un ensayo de “Footprint DNasa” y se definió a la secuencia dIR1-2bis/ IR1-2 como la principal responsable de dicha interacción, donde el patrón ATGT-8N-ACAT (IR1-2) se repite en su forma degenerada GTGT-8N-ACAT (dIR1-2bis) y antecede y se solapa a IR1-2 (Nguyen *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que PadR es un regulador pleiotrópico, que afecta la regulación de genes no relacionados, con base en la localización del elemento bivalente IR1-2 en la región promotora de varios genes de las especies *B. subtilis*, *L. lactis*, *Bacillus anthracis* y *Vibrio cholerae* (Nguyen *et al.*, 2011).

El carácter pleiotrópico de PadR se evaluó en este estudio analizando la presencia de la secuencia IR1-2 en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 mediante el uso de la herramienta bioinformática The Virtual Footprint/PRODORIC que permite predecir la existencia de regulones (Münch *et al.*, 2003; Münch *et al.*, 2005). El motivo ATGT-8N-ACAT (IR1-2) se localizó en la región promotora de 40 genes, de los cuales solo los genes *padR*, *pdC* y *lp\_3015*, presentaron variaciones a nivel transcripcional en presencia del ácido *p*-cumárico. El análisis de las secuencias de nucleótidos situadas “upstream” del codón de iniciación de los genes *pdC*, *padR* y *lp\_3663* muestra que la secuencia dIR1-2bis/IR1-2 sólo está presente en la región promotora de los dos primeros genes; pudiéndose redefinir el motivo regulador de forma más ajustada como AAWCATGT-8N-ACATGWTT (W: A, T) (Tabla XVIII), lo que sugiere que PadR solo controla la respuesta específica proporcionada por el locus *pdC* y no opera como un regulador pleiotrópico al menos considerando la respuesta desencadenada por la presencia del ácido hidroxicinámico estudiado.

Se ha descrito que *lp\_3663* (*usp1*) se co-transcribe con *padR* y que sus niveles de transcripción se incrementan en respuesta al estrés inducido por los ácidos fenólicos, en un modelo que contempla la existencia del operón *padR-lp\_3663* (Gury *et al.*, 2009). Análisis recientes encaminados a dilucidar la función de las proteínas de estrés universal USP en varios grupos de microorganismos, destacan la complejidad de los mecanismos que se activan en las células en respuesta a las presiones del medio ambiente, pero son incapaces de establecer el papel exacto que poseen dichas proteínas (Kvint *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencias de que *lp\_3663* participa en la respuesta global de *L. plantarum* frente al estrés ácido por lo que estudios futuros que incluyan el análisis de micromatrices de ADNc utilizando cepas mutantes deficientes en *padR* y *lp\_3663* u otros genes que codifican proteínas de la familia USP podrían aportar información relevante sobre su función.

**4.2.2.12.5. Mecanismos de regulación anti-terminación por cajas “T-box”:** La regulación de la transcripción (por terminación prematura) y traducción (por interferencia en la iniciación) a través de la formación de una estructura de ARN alternativa en la región 5’ de ciertos genes constituye el mecanismo de regulación del metabolismo de aminoácidos descrito más frecuentemente en bacterias (Vitreschak *et al.*, 2008; Wels *et al.*, 2008). La expresión diferencial de un alto número de genes relacionados con la síntesis y transporte de arginina, asparagina, aspártico, metionina, cisteína y glutamina, sugiere de la posible existencia de cajas

“T-box” implicadas en la red de regulación activada por *L. plantarum* en respuesta a la presencia del ácido *p*-cumárico.

Los resultados del análisis transcriptómico permiten establecer que un total de 10 operones se regularon por este mecanismo. La caja “T-box” Met comprende 7 operones de los cuales 5 se expresaron diferencialmente en este estudio: el operón *lp\_1374* a *lp\_1375* (*metH*, y *metE*); el operón *lp\_1744* a *lp\_1746* (*metN*, *metP* y *metQ*); el operón *lp\_2535* a *lp\_2537* (*hom*, *metY* y *metA*); *lp\_2634* (*metB*); y *lp\_3214* (transportador ABC de cistationina) (TablaXIX).

Las cajas “T-box” Ans, Arg, Ile, Tyr y Val regularon la expresión de un operón cada una para un total de 6 (con dos genes en la caja Ans). Dos de los tres genes que codifican proteínas que participan en el transporte de aminoácidos de cadena ramificada se regularon a través de las “T-box” Ile y Val (*brnQ1* y *brnQ3*) incrementando sus niveles de transcripción, mientras que se observó una represión la expresión de *brnQ2* (*lp\_0399*), gen que podría estar involucrado en el transporte de leucina y que aparentemente no está bajo este tipo de regulación.

**Tabla XIX.** Genes regulados por T-box en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en respuesta al ácido *p*-cumárico.

| Gene ID <sup>a</sup> | Locus        | Descripción   | No. de genes / operon | Tipo de T-box <sup>b</sup> | Genes de respuestas <sup>c</sup>                 |
|----------------------|--------------|---|-----------------------|----------------------------|--|
| <i>lp_0399</i>       | <i>brnQ1</i> | proteína de transporte de amino ácidos de cadena ramificada             | 2                     | Val                        | <i>lp_0399</i>                                   |
| <i>lp_0957</i>       | <i>asnA</i>  | aspartato-amoniaco ligasa   | 1                     | Asn                        | <i>lp_0957</i>                                   |
| <i>lp_1375</i>       | <i>metE</i>  | 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase | 3                     | Met                        | <i>lp_1374</i> ; <i>lp_1375</i>                  |
| <i>lp_1391</i>       | <i>argS</i>  | arginina-tRNA ligasa  | 1                     | Arg                        | <i>lp_1391</i>                                   |
| <i>lp_1744</i>       |              | transportador ABC de amino ácidos, proteína uniendo ATP                 | 4                     | Met                        | <i>lp_1744</i> ; <i>lp_1745</i> ; <i>lp_1746</i> |
| <i>lp_2537</i>       | <i>metA</i>  | homoserina O-succiniltransferasa  | 3                     | Met                        | <i>lp_2535</i> ; <i>lp_2536</i> ; <i>lp_2537</i> |
| <i>lp_2634</i>       | <i>metB</i>  | O-succinilhomoserina (tiol)-liasa                                       | 2                     | Met                        | <i>lp_2634</i>                                   |
| <i>lp_3214</i>       |              | transportador ABC de amino ácidos, proteína uniendo sustrato            | 1                     | Met                        | <i>lp_3214</i>                                   |
| <i>lp_3338</i>       | <i>nha2</i>  | Na(+)/H(+) antiporter   | 2                     | Tyr                        | <i>lp_3337</i> ; <i>lp_3338</i>                  |
| <i>lp_3466</i>       | <i>brnQ3</i> | proteína de transporte de amino ácidos de cadena ramificada             | 1                     | Ile                        | <i>lp_3466</i>                                   |

<sup>a</sup> El *lp* número indica el número del gen en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1 (Acc. Nr. AL935263.2) y especifica el primer gen del “operón” localizado “downstream” de la caja T-box correspondiente

<sup>b</sup> La ocurrencia de éstas y otras cajas T-boxes puede encontrarse con detalle en Wels *et al.* (2008).

<sup>c</sup> Genes que responden al ácido *p*-cumárico que forman parte del operón ubicado “downstream” de la caja T-box correspondiente.

En *L. plantarum* un claro ejemplo de la presencia de redes de regulación interconectadas es la existencia de dos vías diferentes que actúan en el control de la síntesis de asparagina: por una parte el mecanismo terminación-anti-terminación “T-box” media en la transcripción diferencial de *asnA* (*lp\_0957*, que codifica la enzima asparagina sintetasa) y de *asnS1* (*lp\_0956*, la asparaginil-ARNt sintetasa); y por la otra la expresión de estos genes también está controlada por el producto del gen *lp\_2521*, la proteína reguladora AsnC.

En esta sección se han descrito las redes que participan en la respuesta que *L. plantarum* WCFS1 despliega frente a la presencia de compuestos fenólicos como el ácido *p*-cumárico, indicando la existencia de un engranaje en la maquinaria celular que se vale de mecanismos de doble o múltiple regulación para lograr los ajustes finos requeridos a nivel metabólico en un momento dado. Finalmente, se sugiere que el entrecruzamiento de estas redes y su eficiente articulación le confiere a esta cepa ventajas competitivas que le permiten contrarrestar los efectos tóxicos de ciertas sustancias que están presentes en sus hábitats naturales.

#### **4.2.3. INTERACCIONES E INTERCONEXIONES ENTRE *L. PLANTARUM*, LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y EL AMBIENTE INTESTINAL**

La biodisponibilidad de los compuestos fenólicos tal y como se presentan en los alimentos de origen vegetal es generalmente muy baja y en el intestino delgado tan solo se absorbe una pequeña fracción del total que es ingerido. Una parte importante de estos compuestos, tanto de ácidos fenólicos como de polifenoles, llegan al colon intactos y es allí donde son degradados por la microbiota intestinal a ácidos fenólicos de bajo peso molecular que posteriormente se absorben y transportan al resto de los tejidos del hospedador a través de la circulación sistémica (Deprez *et al.*, 2000; Gonthier *et al.*, 2003). Recientemente se ha sugerido que los regímenes dietéticos pueden alterar las actividades específicas y las características moleculares que presentan los lactobacilos durante su paso y estancia en el ambiente intestinal (Marco *et al.*, 2009; van Dorsten *et al.*, 2012).

Se ha descrito que cuando *L. plantarum* alcanza el intestino delgado, las células responden frente al estrés osmótico producido por las sales biliares elevando los niveles de transcripción de genes asociados al transporte como *lp\_0991* (transportador multidroga). De esta forma se logra la excreción de las sales biliares fuera de la célula (de Vries, 2006; Bron *et al.*, 2006). Así mismo se inducen, el gen responsable por la síntesis de una proteína de choque

alcalino (*lp\_0930*, un parólogo de *uspA*), el gen que codifica una proteasa dependiente de ATP y algunos genes asociados al transporte de cationes, en un mecanismo de osmoprotección que permite restablecer la turgencia celular (de Vries, 2006). Los resultados del análisis de micromatrices de este estudio indican que este patrón de respuesta también se activa en presencia del ácido *p*-cumárico. Estas observaciones permiten sugerir que la bacteria está utilizando el mismo mecanismo para contrarrestar los efectos producidos por diferentes compuestos. En presencia del ácido *p*-cumárico y de forma paralela durante el paso de esta bacteria a través del intestino delgado también se activan otros mecanismos de protección cruzada que incluyen la inducción de los genes involucrados en la biosíntesis del corismato, el incremento en los niveles de transcripción de los genes que codifican un transportador de aminoácidos tipo ABC (*lp\_1744* a *lp\_1746*) y un transportador de oligopéptidos Opp (*lp\_1261* a *lp\_1265*), así como también de un parólogo de la subunidad catalítica de la fumarato reductasa.

Se sugiere que la respuesta de *L. plantarum* frente al estrés producido por ciertos compuestos que forman parte de los sustratos donde él habita, puede proporcionarle cierto grado de preparación para lograr una adaptación eficaz al ambiente adverso del TGI. Es importante recordar que el transporte de péptidos está dentro de los posibles eventos que más se activan en presencia del ácido *p*-cumárico. Se ha descrito que el principal papel que desempeña el transportador OppABCDF es la internalización de oligopéptidos necesarios para la nutrición y el reciclaje de péptidos liberados de la mureína o peptidoglicano (Goodell y Higgins, 1987). Sin embargo, estas actividades requieren de la acción concertada de enzimas muropeptidasas y endopeptidasas y no se observaron cambios en los genes que codifican estas proteínas. Espinosa-Urgel *et al.* (2000) y Monnet (2003) han descrito que los sistemas de proteínas que unen oligopéptidos, equivalentes al complejo OppABCDF pueden estar involucrados en la detección de señales ambientales que en la forma de péptidos median en la adhesión celular. Teniendo esto en cuenta, se sugiere que el alto nivel de inducción de los genes *opp* en presencia del ácido *p*-cumárico puede indicar la activación de un mecanismo destinado a detectar la presencia de péptidos activadores o de señalización que median en la interacción bacteria-ambiente del TGI o en la adhesión a los tejidos del hospedador. Sin embargo, en la actualidad se desconoce la trascendencia que la inducción de los genes *opp* tiene sobre la supervivencia o persistencia de las células de esta especie en el TGI.

La elevada inducción del gene *pdc*, además de producir CO<sub>2</sub> e impedir la acumulación del ácido *p*-cumárico en niveles tóxicos, aumenta la concentración de 4-vinil fenol (producto de la

descarboxilación por acción de la PAD). Estos dos compuestos son aleloquímicos y como tal pueden influir en el crecimiento, supervivencia o reproducción de miembros de otras especies (Li *et al.*, 2010). De esta observación es posible preguntarse si la generación de compuestos volátiles mediante la transformación de los ácidos fenólicos presentes en la dieta puede afectar los mecanismos de comunicación que emplea esta bacteria para interactuar con otros miembros de la microbiota intestinal y con los tejidos de la mucosa del TGI del hospedador.

En conclusión, a través del estudio transcriptómico de la respuesta de *L. plantarum* a los ácidos gálico y *p*-cumárico se ha logrado dilucidar algunos de los mecanismos de tolerancia al estrés que posee este microorganismo probiótico. El perfil de expresión génica revela actividades metabólicas diferentes durante la degradación de estos ácidos fenólicos y contribuye a descifrar la función que desempeña la microbiota intestinal en la conversión de los compuestos fenólicos presentes en la dieta.

El conocimiento de la conducta adaptativa que despliega *L. plantarum* WCFS1 frente al estrés ocasionado por estas sustancias, pone de manifiesto una respuesta que puede ser potencialmente beneficiosa para lograr la detoxificación a nivel intestinal e inducir de forma marcada eventos antioxidantes. La comparación de los datos resultantes del análisis transcripcional realizado en este estudio y de los correspondientes a la respuesta en el ambiente intestinal, muestra que cuando las células de esta especie se exponen a los compuestos fenólicos que forman parte constituyente de los sustratos vegetales donde ellas habitan, podrían experimentar una preparación que les facilitaría su posterior adaptación al TGI.

Este conocimiento puede ser el punto de partida para el diseño y desarrollo de métodos y técnicas que buscan maximizar la supervivencia celular de cepas probióticas en este nicho ecológico.

## **V. CONCLUSIONES**



1. En *L. plantarum* WCFS1 la respuesta transcriptómica al ácido gálico se caracteriza por una elevada inducción de los genes implicados en la actividad galato descarboxilasa y la variación de la expresión de genes relacionados con transporte, transformación de energía y tolerancia a la acidez.
2. El patrón de crecimiento y la alteración de la expresión de *lpdB* y *lpdD* en la cepa *L. plantarum* WCFS1 $\Delta$ lpdC, que no presenta la actividad galato descarboxilasa, muestran el papel esencial que desempeña LpdC en el metabolismo del ácido gálico.
3. El perfil de expresión sugiere que los mecanismos de adaptación en respuesta al ácido gálico incluyen la descarboxilación del ácido fenólico, la activación del flujo del carbono y la inhibición del transporte de amonio.
4. La respuesta transcriptómica al ácido *p*-cumárico se caracterizó por una elevada inducción del gen *pdC* responsable de la actividad PAD descarboxilasa y la variación de la expresión de numerosos genes asociados a fenómenos de estrés general y oxidativo.
5. *L. plantarum* WCFS1 no presenta una segunda actividad PAD2 descarboxilasa que, en ausencia de la PAD descarboxilasa, transforme los ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico a sus 4-vinil derivados.
6. El patrón de crecimiento y la inducción de genes de respuesta a estrés oxidativo en la cepa *L. plantarum* WCFS1 $\Delta$ pad, que no presenta la actividad PAD descarboxilasa, indican la participación de rutas alternativas para resistir los efectos tóxicos del ácido *p*-cumárico.
7. El perfil de expresión sugiere que los mecanismos de adaptación en respuesta al estrés oxidativo generado por la presencia del ácido *p*-cumárico incluyen la inducción de proteasas y chaperonas, la alteración de transportadores de membrana, la activación de genes que codifican proteínas que reciclan metionina y la producción de energía por la vía del malato, así como la inhibición de la expresión de genes relacionados con traducción, procesos de división celular y de transporte de amonio.

8. *L. plantarum* posee redes regulatorias donde los regulones PadR, CstR, HcrA, GlnR y PuR-PyR coordinan la expresión de la mayoría de los genes implicados en la respuesta frente al ácido *p*-cumárico.
  
9. El perfil de expresión génica en respuesta a los ácidos gálico y *p*-cumárico revela actividades metabólicas diferentes durante la degradación de estos compuestos en *L. plantarum*.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



- Alberto, M.R., Farías, M.E., Manca De Nadra, M.C. 2001. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4359-4363.
- Alberto, M.R., Farías, M.E., Manca de Nadra, M.C. 2002. Effect of wine phenolic compounds on *Lactobacillus hilgardii* 5w viability. *Journal of Food Protection* 65, 211-213.
- Alberto, M. R., Gómez-Cordovés, M. C., Manca de Nadra, M. C. 2004. Metabolism of gallic acid and catequin by *Lactobacillus hilgardii* from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6465-6469.
- Alberto, M.R., Arena, M.E., Manca de Nadra, M.C. 2007. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: effect of phenolic compounds. *Food Control* 18, 898-903.
- Allen, K.J., Lepp, D., McKellar, R.C., Griffiths, M.W. 2010. Targeted microarray analysis of stationary phase *Escherichia coli* O157:H7 subjected to disparate nutrient conditions. *Journal of Applied Microbiology* 109, 2118-2127.
- Alkema, W.B.L., Lenhard, B., Wasserman, W. 2004. Regulon analysis: detection of conserved regulatory networks across bacteria: application to *Staphylococcus aureus*. *Genome Research* 14, 1362-1373.
- Almenoff, J.S., Williams, S.I., Scheving, L.A., Judd, A.K., Schoolnik, G.K. 1993. Ligand-based histochemical localization and capture of cells expressing heat-stable enterotoxin receptors. *Molecular Microbiology* 8, 865-873.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipmann, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-401.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64, 5245-5250.
- Andersen, J.M., Barrangouc, R., Hachema, M.A., Lahtinen, S., Gohb, Y.J., Svensson, B., Klaenhammer, T.R. 2011. Transcriptional and functional analysis of galactose oligosaccharide uptake by *lacS* in *Lactobacillus acidophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108, 17785-17790.
- Arrecubieta, C., García, E., López, R. 1995. Sequence and transcriptional analysis of DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene* 167, 1-7.
- Arsène-Ploetze, F., Kugler, V., Martinussen, J., Bringel, F. 2006. Expression of the *pyr* operon of *Lactobacillus plantarum* is regulated by inorganic carbon availability through a second regulator, PyrR<sub>2</sub>, homologous to the pyrimidine-dependent regulator PyrR<sub>1</sub>. *Journal of Bacteriology* 188, 8607-8616.
- Arts, I.C., Hollman, P.C. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 317S-325S.
- Aukrust, T., Blom, H. 1992. Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International* 25, 253-261.

- Ayed, L., Hamdi, M. 2002. Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Letters* 24, 1763-1765.
- Bajpai, B., Patil, S. 1997. Tannin acyl hydrolase (EC 3.1 .1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 217-220.
- Banerjee, D., Mondal, K.C., Pati, B.R. 2001. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. *Journal of Basic Microbiology* 41, 313-318.
- Barthelmebs, L., Divies, C., Cavin, J.F. 2000a. Knockout of the *p*-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3368-3375.
- Barthelmebs, L., Lecomte, B., Divies, C., Cavin, J.F. 2000b. Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology* 182, 6724-6731.
- Barthelmebs, L., Divies, C., Cavin, J.F., 2001. Expression in *Escherichia coli* of native chimeric phenolic acid decarboxylases with modified enzymatic activities and method for screening recombinant *E. coli* strains expressing the enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1063-1069.
- Bartolomé, B., Peña-Neira, A., Gómez-Cordovés, C. 2000. Phenolics and related substances in alcohol-free beers. *European Food Research and Technology* 210, 419-423.
- Beier, L., Nygaard, P., Jarmer, H., Saxild, H. 2002. Transcription analysis of the *Bacillus subtilis* PucR regulon and identification of a cis-acting sequence required for *pucR* regulated expression of genes involved in purine catabolism. *Journal of Bacteriology* 184, 3232-3241.
- Benjamani, Y. y Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C, Applied Statistics* 57, 289-300.
- Bhat, T.K., Singh, B., Sharma, O.P. 1998. Microbial degradation of tannins - A current perspective. *Biodegradation* 9, 343-357.
- Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G. 2007. Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 44, 62-67.
- Boekhorst, J., Wels, M., Kleerebezem, M., Siezen, R.J. 2006. The predicted secretome of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sheds light on interactions with its environment. *Microbiology* 152, 3175-3183.
- van Bokhorst-van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, P.A., Kleerebezem, M., Marco, M.L. 2011. Short- and long-term adaptation to ethanol stress and its cross-protective consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5247-5256.

- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E. 2002. Effect of beta-glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2344-2349.
- van Bokhorst-van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, P.A., Kleerebezem, M., Marco, M.L. 2011. Short- and long-term adaptation to ethanol stress and its cross-protective consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5247-5256.
- Bossil, A., Rinalducci, S., Zolla, L., Antonioli, P., Righetti, P.G., Zapparoli, G. 2006. Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach. *Journal of Applied Microbiology* 102, 787-795.
- Bove, P., Capozzi, V., Garofalo, C., Rieu, A., Spano, G., Fiocco, D. 2012. Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiological Research* 167, 187-193.
- Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D.K., Felis, G.E., Torriani, S., Dellaglio, F. 2005. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1629-1634.
- Brown, J.P. 1970. Cytochemical electron microscopic localization of esterase activity in *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology* 19, 1001-1004.
- Bron, P.A., Marco, M., Hoffer, S.M., Van Mullekom, E., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. 2004a. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract. *Journal of Bacteriology* 186, 7829-7835.
- Bron, P.A., Grangette, C., Mercenier, A., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. 2004b. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Bacteriology* 186, 5721-5729.
- Bron, P.A., Molenaar, D., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. 2006. DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 100, 728-738.
- Bron, P.A., Meijer, M., Bongers, R.S., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. 2007. Dynamics of competitive population abundance of *Lactobacillus plantarum* *ivi* gene mutants in faecal samples after passage through the gastrointestinal tract of mice. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1424-1434.
- Brune, A., Schnell, S., Schink, B. 1992. Sequential transhydroxylations converting hydroxyhydroquinone to phloroglucinol in the strictly anaerobic, fermentative bacterium *Pelobacter massiliensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1861-1868.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A. 2002. Plants foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3337-3340.

- Buzrul, S. 2009. A suitable model of microbial growth. *African Journal of Microbiology Research* 3, 468-474.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Hogg T.A. 2003. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 167–174.
- Campos, F.M., Figueiredo, A.R., Hogg, T.A., Couto, J.A. 2009a. Effect of phenolics acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Food Microbiology* 26, 409-414.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Figueiredo, A.R, Tóth, I.V., Rangel, A.O.S.S., Hogg, T.A. 2009b. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 135, 144-151.
- Canales, J., Flores-Monterroso, A., Rueda-López, M., Avila, C., Cánovas, F.M. 2010. Identification of genes regulated by ammonium availability in the roots of maritime pine trees. *Amino Acids* 39, 991-1001.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-149.
- Casadei, M.A., Ingram, R., Hitchings, E., Archer, J., Gaze, J.E. 2001. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology* 63, 125-134.
- Cavin, J. F., Andioc, V., Etievant, P. X., Divies, C. 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 76–80.
- Cavin J.F., Barthelmebs L, Diviès C. 1997a. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1939–1944.
- Cavin J.F., Barthelmebs L, Guzzo, J., Van Beeumen, J., Samyn, B., Travers, J.F., Diviès C. 1997b. Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* 147, 291-295.
- Cecconi, D., Cristofolletti, M., Milli, A., Antonioli, P., Rinalducci, S., Zolla, L., Zapparoli, G. 2009. Effect of tannic acid on *Lactobacillus plantarum* wine strain during starvation: A proteomic study. *Electrophoresis* 30, 957-965.
- Chamkha, M., Labat, M., Patel, B.K., García, J.L. 2001. Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 2049-2054.
- Chamkha, M., Record, E., García, J.L., Asther, M., Labat, M. 2002. Isolation from a shea cake digester of a tannin-tolerant *Escherichia coli* strain decarboxylating *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids. *Current Microbiology* 44, 341-349.



- Champomier-Vergès, M.C., Maguin, E., Mistou, M.Y., Anglade, P., Chich, J.F. 2002. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B* 771, 329-342.
- Chastanet, A., Fert, J., Msadek, T. 2003. Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 47, 1061-1073.
- Chatonnet, P., Dubordieu, D., Boidron, J. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 463-468.
- Chen, P.M., Chan, Y.Y.M., Yu, S.L., Sher, S., Lai, C.H., Chia, J.S. 2010. Role of GlnR in acid-mediated repression of genes encoding proteins involved in glutamine and glutamate metabolism in *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2478-2486.
- Cho, B.K., Federowicz, S.A., Embree, M., Park, Y.S., Kim, D., Palsson, O. 2011. The PurR regulon in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Nucleic Acids Research* 39, 6456-6464.
- Chung, K.T., Lu, Z., Chou, M.W. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 36, 1053-1060.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N., 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4142-4147.
- Clausen, M., Lamb, C.J., Megnet, R., Doerner, P.W. 1994. PAD1 encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 142, 107-112.
- Conroy, M.J., Durand, A., Lupo, D., Li, X.D., Bullough, P.A., Winkler, F.K., Merrick, M. 2007. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 1213-1218.
- Couto, J.A., Campos, F.M., Figueiredo, A.R., Hogg, T.A. 2006. Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 166-171.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. (Editores). American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA Cap 24, 1250-1318.
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Martínez-Alvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F., Basilio, A., López Rivas, C., Requena, T., Rodríguez, J.M., Bartolomé, B. 2010. Antimicrobial activity of phenolics acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* 16, 372-382.
- Curiel, J.A. 2010. Degradación de galotaninos por *Lactobacillus plantarum*: Estudio genético y funcional de las enzimas tanasa y galato descarboxilasa. Tesis Doctoral.

- Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Física Aplicada. Madrid, España, 159 pp.
- Curiel, J.A., Rodríguez, H., Landete, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R. 2010. Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry* 120, 225-229.
- Curiel, J.A., Rodríguez, H., de las Rivas, B., Anglade, P., Baraige, F., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M., Muñoz, R., López de Felipe, F. 2011. Response of a *Lactobacillus plantarum* human isolate to tannic acid challenge assessed by proteomic analyses. *Molecular Nutrition Food Research* 55, 1454-1465.
- Deghorain, M., Goffin, P., Fontaine, L., Mainardi, J.L., Hols, P. 2007. Selectivity for lactate incorporation into the peptidoglycan precursors of *Lactobacillus plantarum*: role of Aad, a VanX-like d-alanyl-d-alanine dipeptidase. *Journal of Bacteriology* 189, 4332-4337.
- Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., Scalbert, A. 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *The Journal of Nutrition* 130, 2733-2738.
- Derré, I., Rapoport, G., Msadek, T. 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 31, 117-131.
- Di Cagno, R., Surici, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon J-C., Buchin, S., De Gara, L., Gobbetti, M. 2009. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensorial properties of tomato juices. *International Journal of Food Microbiology* 127, 220-228.
- Dimitrios, B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology* 17, 505-512.
- Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A.P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A. 2005. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research* 591, 237-246.
- van Dorsten, F.A., Peters, S., Gross, G., Gomez-Roldan, V., Klinkenberg, M., de Vos, R.C., Vaughan, E.E., van Duynhoven, J.P., Possemiers, S., van de Wiele, T., Jacobs, D.M. 2012. Gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red wine/grape juice is source-specific and colon-region dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11331-11342.
- Duary, R.K., Batish, V.K., Grover, S. 2010. Expression of the *atpD* gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* acidic conditions using RT-qPCR. *Research in Microbiology* 161, 399-405.
- Duong, T., Barrangou, R., Russell, W.M., Klaenhammer, T.R. 2006. Characterization of the *tre* locus and analysis of trehalose cryoprotection in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied Environment and Microbiology* 72, 1218-25.

- Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A.E. 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research* 30, 207-210.
- El-Hawary, S.A., Sokkar, N.M., Ali, Z.Y., Yehia, M.M. 2012. A profile of bioactive compounds of *Rumex vesicarius* L. *Journal of Food Science* 76, C1195-1202.
- Ells, T.C., Truelstrup Hansen, L. 2011. Increased thermal and osmotic stress resistance in *Listeria monocytogenes* 568 grown in the presence of trehalose due to inactivation of the phosphotrehalase-encoding gene *treA*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 6841-6851.
- El-Seedi, H.R., El-Said, A.M.A., Khalifa, S.A.M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A-K., Verpoorte, R. 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 10877–10895.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., Ramos, J.L. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of Bacteriology* 182, 2363–2369.
- Euzéby, J. P. 2013. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature-Genus *Lactoba-cillus*. En: <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html> [citado el 08.04.13].
- Fernandez-Lorente, G., Bolivar, J.M., Rocha-Martin, J., Curiel, J.A., Muñoz, R., de las Rivas, B., Carrascosa, A.V., Guisan, J.M. 2011. Synthesis of propyl gallate by transesterification of tannic acid in aqueous media catalysed by immobilized derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry* 128, 214-217.
- Fiocco, D., Collins, M., Muscariello, L., Hols, P., Kleerebezem, M., Msadek, T., Spano, G. 2009. The *Lactobacillus plantarum* *ftsH* gene is a novel member of the CtsR stress response regulon. *Journal of Bacteriology* 195, 1688–1694.
- Fiocco, D., Capozzi, V., Collins, M., Gallone, A., Hols, P., Guzzo, J., Weidmann, S., Rieu, A., Msadek, T., Spano, G. 2010. Characterization of the CtsR stress response regulon in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 192, 896-900.
- Fleming, H.P., Walter, W.M., Etchells, J.L. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Applied Microbiology* 20, 777-782.
- Fleuriet, A. y Macheix, J. J. 1998. Phenolics acids in fruits and vegetables. En: *Flavonoids in Health and Disease*. 2da. Edición. Rice-Evans, C.A. y Packer, L. (Editores). Cap. 1, 1-42.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V. 2009. Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1042-1053.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. 2011. Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of oenological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 145, 426-431.

- Gardner, N.J., Savarda, T., Obermeierb, P., Caldwellb, G., Champagne, C.P. 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology* 64, 261-275.
- Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R. 2010. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied Environmental Microbiology* 76, 5005-5012.
- Gonthier, M.P., Cheynier, V., Donovan, J.L., Manach, C., Morand, C., Mila, I., Lapiere, C., Rémésy, C., Scalbert, A. 2003. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *The Journal of Nutrition* 133, 461-467.
- Goodell, E.W. y Higgins, C.F. 1987. Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 169, 3861-3865.
- Grandvalet, C., Coucheney, F., Beltramo, C., Guzzo, J. 2005. CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *Journal of Bacteriology* 187, 5614-5623.
- Gunka, K., Commichau, F. 2012. Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Molecular Microbiology* 85, 213-224.
- Gury, J., Barthelmebs, L., Tran, N.P., Diviès, C., Cavin, J.F. 2004. Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding *padA* gene of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2146-2153.
- Gury, J., Seraut, H., Tran, N.P., Barthelmebs, L., Weidmann, S., Gervais, P., Cavin, J.F. 2009. Inactivation of PadR, the repressor of the phenolic acid stress response, by molecular interaction with Usp1, a universal stress protein from *Lactobacillus plantarum*, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5273-5283.
- Gustavsson, N., Diez, A., Nyström, T. 2002. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Molecular Microbiology* 43, 107-117.
- Guyer, C.A., Morgan, D.G., Staros, J.V. 1986. Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding protein from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 168, 775-779.
- Guzmán-López, O., Loera, O., Parada, J.L., Castillo-Morales, A., Martínez-Ramírez, C., Augur, C., Gaime-Perraud, I., Saucedo-Castañeda, G. 2009. Microcultures of lactic acid bacteria: optimization of nutrients and gallic acid concentration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 11-20.
- Guzzo, J. 2012. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44, 1698-1705.
- Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 268S-276S.

- Hammes, W., Schleifer, K.H., Kandler, O. 1973. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* 116, 1029–1053.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- van Hellemond, J.J., Tielens, A.G.M. 1994. Expression and functional properties of fumarate reductase. *Biochemistry Journal* 304, 321-331.
- Holden, J.T., Utech, N.M. 1967. Effect of biotin, pantothenic acid and nicotinic acid deficiencies on amino acid transport in *Lactobacillus plantarum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 135, 517-31.
- Horman, I., Brambilla, E., Stalder, R. 1981. Evidence against the reported antithiamine effect of caffeic and chlorogenic acids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 51, 385-390.
- Hüfner, E., Britton, R.A., Roos, S., Jonsson, H., Hertel, C. 2008. Global transcriptional response of *Lactobacillus reuteri* to the sourdough environment. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 323-338.
- Huycke, M.M., Moore, D., Joyce, W., Wise, P. 2001. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Molecular Microbiology*, 42, 729–740.
- Iwamoto, K., Tsuruta, H., Nishitani, Y., Osawa, R., 2008. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (T). *Systematic and Applied Microbiology* 31, 269–277.
- Jiménez, N., Curiel, J.A., Reverón, I., de Las Rivas, B., Muñoz, R. 2013. Uncovering the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 gallate decarboxylase involved in tannin degradation. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4253-4263.
- Joo, Y.J., Kim, J.H., Kang, U.B., Yu, M.H., Kim, J. 2011. Gcn4p-mediated transcriptional repression of ribosomal protein genes under amino-acid starvation. *The EMBO Journal* 30, 859–872.
- Juven, B. y Henis, Y. 1970. Studies on the antimicrobial activity of olive phenolics compounds. *Journal of Applied Bacteriology* 33, 721-732.
- Kang, O.J., Laberge, S., Simard, R.E. 2003. Detection and localization of a peptidoglycan hydrolase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science* 86, 96-104.
- Kapfhammer, D., Karatan, E., Pflughoeft, K.J., Watnick, P.I. 2005. Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities. *Applied and Environment Microbiology* 71, 3840-3847.
- Kapur, C. y Kapoor, H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's health. *International Journal of Food Science and Technology* 36, 703-725.

- Kim, B.C., Gu, M.B. 2006. Expression analysis of stress-specific responsive genes in two-stage continuous cultures of *Escherichia coli* using cDNA microarray and real-time RT-PCR analysis. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 440-446.
- Kleerebezem M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Lankhorst, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.R., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 1990–1995.
- Kölling, R. y Lother, H. 1985. AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase a transcription in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 164, 310-315.
- Kormelink, T.G., Koenders, E., Hagemeijer, Y., Overmars, L., Siezen, R.J., de Vos, W.M. Francke, C. 2012. Comparative genome analysis of central nitrogen metabolism and its control by GlnR in the class Bacilli. *BMC Genomics* 13, 191-206.
- Kosono, S., Ohashi, Y., Kawamura, F., Kitada, M. 2000. Function of a principal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, ShaA, is required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 182, 898-904.
- Kostrzynska, M., Betts, J.D., Austin, J.W., Trust, T.J. 1991. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *Journal of Bacteriology* 173, 937-946.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305, 567-80.
- Kumar R.A., Gunasekaran P., Lakshmanan M. 1999. Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from a tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology* 39, 161-168.
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., Nyström, T. 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology* 6, 140-145.
- Lamberti, C., Purrotti, M., Mazzoli, R., Fattori, P., Barello, C., Coïsson, J.D., Giunta, C., Pessione, E. 2011. ADI pathway and histidine decarboxylation are reciprocally regulated in *Lactobacillus hilgardii* ISE 5211: proteomic evidence. *Amino Acids* 41, 517-527.
- Landete, J.M., Rodríguez, H., de las Rivas, B., Muñoz, R. 2007. High-added-value antioxidants obtained from the degradation of wine phenolics by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Protection* 70, 2670-2675.
- Landete, J.M., Curiel, J.A., Rodríguez, H., de las Rivas, B., Muñoz, R. 2008. Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry* 107, 320-326.
- Larsen, R., Kloosterman, T.G., Kok, J., Kuipers, O.P. 2006. GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 188, 4978–4982.

- Lekha, P.K., Lonsane, B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Applied Microbiology* 44, 215-260.
- Lewis, J.A., Starkey, R.L. 1969. Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms. *Soil Science* 107, 235-241.
- Li, J., Bi, Y., Dong, C., Yang, J. Liang, W. 2011. Transcriptome analysis of adaptative heat shock response of *Streptococcus thermophilus*. *PLoS One* 6, e25777.
- Li, M., Kai, Y., Qiang, H., Dongying, J. 2006. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal of Basic Microbiology* 46, 68-84.
- Li, Z.H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.D., Jiang, D.A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15, 8933-8952.
- Licandro-Seraut, H., Gury, J., Tran, N.P., Barthelmebs, L., Cavin, J.F. 2008. Kinetics and intensity of the expression of genes involved in the stress response tightly induced by phenolic acids in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14, 41-47.
- Livak, K.J. y 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.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., Li, J. 2012. *p*-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* 25, 550-554.
- Lovanov, K.V., Korol'kova, N.V., Eremina, S.Y., Lopes, E., Mironov, A.S. Mutation analysis of the purine operon leader region in *Bacillus subtilis*. *Russian Journal of Genetics* 47, 785-793.
- Luo, S. y Levine, R.L. 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB Journal* 23, 464-472.
- Lupa, B., Lyon, D., Gibbs, M.D., Reeves, R.A., Wiegel, J. 2005. Distribution of genes encoding the microbial non-oxidative reversible hydroxyarylic acid decarboxylases / phenol carboxylases. *Genomics* 86, 342-351.
- Lynd, R.L., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506-577.
- Lyons, M.M., Yu, C., Toma, R.B., Cho, S.Y., Reiboldt, W., Lee, J., Van Breemen, R.B. 2003. Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5867-5870.
- Macheix, J.J., Fluriet A., Billot, J. 1990. Fruit Phenolics. En: CRC Press. Boca Raton, Florida. USA. p 378.
- Marco, M.L., Bongers, R.S., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. 2007. Spatial and temporal expression of *Lactobacillus plantarum* genes in the gastrointestinal tracts of mice. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 124-132.
- Marco, M.L., Peters, T.H., Bongers, R.S., Molenaar, D., van Hemert, S., Sonnenburg, J.L., Gordon, J.I., Kleerebezem, M. 2009. Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. *Environmental Microbiology* 11, 2747-2757.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. 2008. Brock Biology of Microorganisms. 12va. Edición. Prentice Hall International, Inc. Upper Saddle River, New Jersey. USA. 986 pp.
- Maga, J.A. 1978. Simple phenol and phenolics compounds in food flavor. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 10, 323-372.
- Mager, W.H. 1988. Control of ribosomal protein gene expression. Biochimica et Biophysica Acta 949, 1-15.
- Mahmood, T., Anwar, F., Abbas, M., Saari, N. 2012. Effect of maturity on phenolics (phenolic acids and flavonoids) profile of strawberry cultivars and mulberry species from Pakistan. International Journal of Molecular Science 13, 4591-4607.
- Mainardi, J.L., Villet, R., Bugg, T.D., Mayer, C. 2008. Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiology Reviews 32, 386-408.
- Maistro, E.L., Angeli, J.P.F., Andrade, S.F., Mantovani, M.S. 2011. In vitro genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. Genetics and Molecular Research 10, 1130-1140.
- Maldonado-Sánchez, A.F., Schieber, A., Gänzle, M.G. 2011. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology 111, 1176-1184.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition 79, 727-747.
- Manderson, G.J. y Doelle, H.W. 1972. The effect of oxygen and pH on the glucose metabolism of *Lactobacillus casei* var. *rhannosus* ATCC 7469. Antonie Van Leeuwenhoek 38, 223-240.
- Marco, M.L. y Kleerebezem M. 2007. Assessment of real-time RT-PCR for quantification of *Lactobacillus plantarum* gene expression during stationary phase and nutrient starvation. Journal of Applied Microbiology 104, 587-594.
- Marco, M.L., Peters, T.H., Bongers, R.S., Molenaar, D., van Hemert, S., Sonnenburg, J.L., Gordon, J.I., Kleerebezem, M. 2009. Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. Environmental Microbiology 11, 2747-2757.
- Marchesi, V.T. 1968. Problems in the localization of membrane-bound enzymes by electron microscopic cytochemistry. The Wistar Institute Symposium Monograph 8, 39-51.
- Marsilio, V. y Lanza, B. 1998. Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. Journal of the Science of Food and Agriculture 76, 520-524.
- Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N. 1996. Progress in table olive debittering: degradation *in vitro* of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. Journal of American Oil Chemists' Society 73, 593-597.



- Mathiesen, G., Sveen, A., Brurberg, M.B., Fredriksen, L., Axelsson, L., Eijsink, V.G. 2009. Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics* 10, 425.
- McLeod, A., Snipen, L., Naterstad, K., Axelsson, L. 2011. Global transcriptome response in *Lactobacillus sakei* during growth on ribose. *BMC Microbiology* 11, 145.
- Mehansho, H., Butler, L.G., Carlson, D.M. 1987. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. *Annual Review of Nutrition* 7, 423-40.
- Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F.H., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kleerebezem, M. 2005. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *Journal of Bacteriology* 187, 6119-6127.
- Monnet, V. 2003. Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60, 2100-2114.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Muñoz, R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117-123.
- Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E., Jahn, D. 2003. PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Research* 31, 266-269.
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., Jahn, D. 2005. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* 21, 4187-4189.
- Nicoloff, H., Hubert, J.C., Bringel, F. 2000. In *Lactobacillus plantarum*, carbamoyl phosphate is synthesized by two carbamoyl-phosphate synthetases (CPS): carbon dioxide differentiates the arginine-repressed from the pyrimidine-regulated CPS. *Journal of Bacteriology* 182, 3416-3422.
- Nicoloff, H., Elagöz, A., Arsène-Ploetze, F., Kammerer, B., Martinussen, J., Bringel, F. 2005. Repression the *pyr* operon in *Lactobacillus plantarum* prevents its ability to grow at low carbon dioxide levels. *Journal of Bacteriology* 187, 2093-2104.
- Nierenstein, M. 1930. Galls. *Nature* 125, S348-349.
- Nishitani, Y., Osawa, R., 2003. A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 54, 281-284.
- Nishitani, Y., Sasaki, E., Fujisawa, T., Osawa, R., 2004. Genotypic analysis of lactobacilli with a range of tannase activities isolated from human feces and fermented foods. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 109-117.
- Noguchi, N., Ohashi, T., Shiratori, T., Narui, K., Hagiwara, T., Ko, M., Watanabe, K., Miyahara, T., Taira, S., Moriyasu, F., Sasatsu, M. 2007. Association of tannase-producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene. *Journal of Gastroenterology* 42, 346-51.

- Odenyoa, A.A., Bishopb, R., Asefaa, G., Jamnadassb, R., Odongob, D., Osujia, P. 2001. Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from east african ruminants. *Anaerobe Ecology/Environmental Microbiology* 7, 5-15.
- O'Donovan, L., Brooker, J.D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology* 147, 1025-33.
- Oliveros, J.C. 2007. FIESTA Viewer: Gene Expression data handling made easy. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>.
- Olsen, H., Grimmer, S., Aaby, K., Saha, S., Borge, G.I.A. 2012. Antiproliferative effects of fresh and thermal processed green and red cultivars of curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 7375–7383.
- Osawa, R., Fujisawa, T., Sly, L.I. 1995. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Systematic and Applied Microbiology* 18, 74–78.
- Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S., Shimizu, A., 2000. Isolation of tannin-degrading lactobacilli from human and fermented foods. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3093-3097.
- Padan, E., Tzuberly, T., Herz, K., Kozachkov, L., Rimon, A., Galili, L. 2004. NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Biochimica et Biophysica Acta* , 2-13.
- Pessione, E., Mazzoli, R., Giuffrida, M.G., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barello, C., Conti, A., Giunta, C. 2005. A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics* 5, 687-698.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2002-2007.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26, 509–515.
- Pieterse, B., Leer, R.J., Schuren, F.H., van der Werf, M.J. 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* 151, 3881-3894.
- Pieterse, B., Jellema, R.H., van der Werf, M.J. 2006. Quenching of microbial samples for increased reliability of microarray data. *Journal of Microbiological Methods* 64, 207-216.
- Pietinen, P., Stumpf, K., Männistö, S., Kataja, V., Uusitupa, M., Adlercreutz, H. 2001. Serum enterolactone and risk of breast cancer: a case-control study in eastern Finland. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 10, 339-44.
- Piškur, J., Ling, Z., Marcet-Houben, M., Ishchuk, O.P., Aerts, A., LaButti, K., Copeland, A., Lindquist, E., Barry, K., Compagno, C., Bisson, L., Grigoriev, I.V., Gabaldón, T.,

- Phister, T. 2012. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *Journal of Food Microbiology* 157, 202-209.
- Poggio, S., Domeinzain, C., Osorio, A., Camarena, L. 2002. The nitrogen assimilation control (Nac) protein represses *asnC* and *asnA* transcription in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 206, 151-156.
- Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E.J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P.P., Konings, W.N. 1991. Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *Journal of Bacteriology* 173, 6030-6037.
- Poussier, M., Guilloux-Benatier, M., Torres, M., Heras, M., Adrian, M. 2003. Influence of different maceration techniques and microbial enzymatic activities on wine stilbene content. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 261-266.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90, 494-507.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., Rozès, N. 2000. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 1065-1071.
- de Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A. 2005. Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiology* 22, 569-575.
- Reverón, I., Barreiro, J.A., Sandoval, A.J. 2005. Thermal death characteristics of *Lactobacillus paracasei* and *Aspergillus niger* in Pilsen beer. *Journal of Food Engineering* 66, 239-243.
- Reverón, I., de Las Rivas, B., Muñoz, R., López de Felipe, F. 2012. Genome-wide transcriptomic responses of a human isolate of *Lactobacillus plantarum* exposed to *p*-coumaric acid stress. *Molecular Nutrition and Food Research* 56, 1848-59.
- Reverón, I., Rodríguez, H., Campos, G., Curiel, J.A., Ascaso, C., Carrascosa, A.V., Prieto, A., de las Rivas, B., Muñoz, R., López de Felipe, F. 2013. Tannic acid-dependent modulation of selected *Lactobacillus plantarum* traits linked to gastrointestinal survival. *PLoS One* 8, e66473.
- Ribéreau-Gayon, P. 1974. The chemistry of wine color. En: *Chemistry of winemaking. Advances in Chemistry Series*, 137. Webb, A.D. (Editores). Washinton DC, USA. Cap.3, 50-87.
- Rimando, A.M., Kalt, W., Magee, J.B., Dewey, J., Ballington, J.R. 2004. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4713-4719.
- de las Rivas, B., Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., Muñoz, R. 2009. Molecular screening of wine lactic acid bacteria degrading hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 490-494.
- Robbins, R.J. 2003. Phenolics acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2866-2887.

- Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 197-207.
- Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., Muñoz, R. 2008a. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748<sup>T</sup>. *Food Chemistry* 107, 1393-1398.
- Rodríguez, H., Landete, J.M., Curiel, J.A., de las Rivas, B., Mancheño, J.M., Muñoz, R. 2008b. Characterization of the *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748<sup>T</sup>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 3068-3072.
- Rodríguez, H., de las Rivas, B., Gómez-Cordovés, C., Muñoz, R., 2008c. Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry* 107, 664-670.
- Rodríguez, H., de las Rivas, B., Gómez-Cordovés, C., Muñoz, R. 2008d. Characterization of tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748<sup>T</sup>. *International Journal of Food Microbiology* 121, 92-98.
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J. M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 132, 79-90.
- Rodríguez, H. 2009. Biotransformación de compuestos fenólicos agroalimentarios por *Lactobacillus plantarum*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Ecología. Madrid, España, 160 pp.
- Rodríguez, H., Angulo, I., de las Rivas, B., Campillo, N., Páez, J.A., Muñoz, R., Mancheño, J.M. 2010. *p*-Coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: structural insights into the active site and decarboxylation catalytic mechanism. *Proteins* 78, 1662-1676.
- Rozès, N., Peres, C. 1996. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 839-843.
- Rozès, N., Peres, C. 1998. Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 108-111.
- Rozès, N., Arola, L., Bordons, A., 2003. Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by *Oenococcus oeni* from wine. *Letters in Applied Microbiology* 36, 337-341.
- Ruiz-Barba, J. L., Rios-Sánchez, R. M., Fedriani-Iriso, C., Olias, J. M., Jiménez-Díaz, R. 1990. Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 199-205.
- Ruiz-Barba, J.L., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R. 1991. Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology* 12, 65-68.

- Salih, A.G., Le Quéré, J.M., Drilleau, J.F. 2000. Action des acides hydroxycinnamiques libres et esterifiés sur la croissance des bactéries lactiques. *Science des Aliments* 20, 537-560.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol 1-3. 2da. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N.Y., USA.
- Sánchez-Maldonado, A.F., Schieber, A., Gänzle, M.G. 2011. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 111, 1176-1184.
- Saulnier, D.M.A., Molenaar, D., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Kolida, S. 2007. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1753–1765.
- Saxena, R.K., Sharmila, P, Singh, V.P. 1995. Microbial degradation of tannins. Singh, V.P. *Progress In Industrial Microbiology. Biotransformations: Microbial Degradation of Health Risk Compounds* 32, 259-270.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
- Schumann, W. 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. Review. *Cell stress & Chaperones* 8, 207-217.
- Sekar, V. 1987. A rapid screening procedure for the identification of recombinant bacterial clones. *BioTechniques* 5, 11-13.
- Selma, M.V., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 6485-6501.
- Serrano, L.M., Molenaar, D., Wels, M., Teusink, B., Bron, P.A., de Vos, W.M., Smid, E.J. 2007. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories* 6, 29.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.M., Saura-Calixto, F. 2009. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability, and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, 310-329.
- Sestelo, A.B.F., Poza, M., Villa, T.G. 2004.  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 633–637.
- Shahidi, F. y Naczk, M. 2004. *Phenolics in food and nutraceuticals*. 2004. CRC Press LLC, Boca Raton. Florida, USA. p. 131.
- Siegenthaler, P., Neuenschwander, M., Bradoo, S., Gupta, R., Saxena, R.K. 1997. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry* 32, 135-139.
- Siezen, R.J., Boekhorst, J., Muscariello, L., Molenaar, D., Renckens, B., Kleerebezem, M. 2006. *Lactobacillus plantarum* gene clusters encoding putative cell-surface protein complexes for carbohydrate utilization are conserved in specific gram-positive bacteria. *BMC Genomics* 7, 126.

- Siezen, R.J. y Wilson, G. 2010. Probiotics genomics. *Microbial Biotechnology* 3, 1-9.
- Siezen, R.J. y van Hylckama Vlieg, J.E.T. 2011. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories* 10, S3.
- Siezen, R.J., Francke, C., Renckens, B., Boekhorst, J., Wels, M., Kleerebezem, M., van Hijum, S.A. 2012. Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. *Journal of Bacteriology* 194, 195-196.
- Silva, I., Campos, F.M., Hogg, T., Couto, J.A. 2011. Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 145, 471-475.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 7, 33.
- Silver, J.D. 2009. Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*, 10(2): 352-363.
- Smid, E.J. y Lacroix, C. 2012. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 24, 148-154.
- Simic, A., Manojlovic, D., Segan, D., Todorovic, M. 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules* 12, 2327-2340.
- Smyth, G. K. y Speed, T. 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265-273.
- Smyth, G.K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, 1544-6115.
- Soballe, B. y Poole, R.K. 2000. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146, 787-796.
- Sonenshein, A. 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature Review* 5, 917-927.
- Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L., Beneduce, L., Massa, S., 2005. A  $\beta$ -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *Journal of Applied Microbiology* 98, 855-861.
- Sri, B.M., Rukkumanni, R., Menon, V.P. 2003. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. *Acta Diabetologica* 40, 118-122.
- Stead, D. 1994. The effect of chlorogenic, gallic and quinic acids on the growth of spoilage strains of *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus brevis*. *Letters in Applied Microbiology* 18, 112-114.
- Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36, 1-29.

- Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., Peláez, C., Requena, T. 2011. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology* 28, 1345-1352.
- Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J. D., Jacobs, A.R., Kiryutin, B., Koonin, E.V., Krylov, D.M., Mazumder, R, Mekhedov, S.L., Nikolskaya, A.N., Rao, B.S., Smirnov, S., Sverdlov, A.V., Vasudevan, S., Wolf, Y.I., Yin, Y.J., Natale, D.A. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4, 41-55.
- Tempest, T.W. y Neijssel, O.M. 1984. The status of  $Y_{ATP}$  and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. *Annual Review of Microbiology* 38, 459-513.
- Thompson, J. y Thomas, T.D. 1977. Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: endogenous energy source(s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 130, 583-95.
- Tilman J. Todt, T.J., Wels1, M., Bongers R.S., Siezen, R.S., Sacha A. F. T. van Hijum, S.A.F.T., Kleerebezem, M. 2012. Genome-wide prediction and validation of Sigma70 promoters in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *PLoS One* 7, e45097.
- Tohge, T, Watanabe, M., Hoefgen, R., Fernie, A.R. 2013. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science* 4, 1-13.
- Tomás-Barberán, F.A. y Clifford, M.N. 2000. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1024-1032.
- Torriani, S., Felis, G. E., Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3450-3454.
- Turnbough, C.L. Jr. y Switzer, R.L. 2013. Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 266–300.
- Ugliano M, Genovese A, Moio L. 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5073-5078.
- Valbuena, E., Barreiro, J.A., Sánchez, E., Castro G., Bríñez, W., Tovar, A. 2005. Modelos cinéticos aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche. *Revista Científica de la Universidad del Zulia* 15, 464-475.
- Vanbeneden, N., Van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F., Delvaux, F.R. 2008. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chemistry* 111, 83-91.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, 0034.1–0034.11

- Vaquero, I., Marcobal, A., Muñoz, R. 2004. Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 96, 199-204.
- Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Lyubetsky, V.A., Gelfand, M.S. 2008. Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. *RNA* 174, 717-735.
- Vivas, N., Lonvaud-Funel, A., Glories, Y. 1997. Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food Microbiology* 14, 291-300.
- Vivas, N., Agustin, M., Lonvaud-Funel, A. 2000. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos* 8413). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1675-1678.
- de Vries, M.C. 2006. Analyzing global gene expression of *Lactobacillus plantarum* in the human gastrointestinal tract. Tesis PhD. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands. 147 pp.
- Wang, J., Zhong, Z., Zhang, W., Bao, Q., Wei, A., Meng, H., Zhang, H. 2012. Comparative analysis of the gene expression profile of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang with and without fermented milk as a vehicle during transit in a simulated gastrointestinal tract. *Research in Microbiology* 163, 357-365.
- Warner, J.R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemistry Science* 24, 437-440.
- Wassinger, A., Zhang, L., Tracy, E., Munson, R.S. Jr., Kathariou, S., Wang, H.H. 2013. Role of a GntR-family response regulator LbrA in *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *PLoS One* 8, e70448.
- Wells, J.E., Berry, E.D., Varel, V.H. 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Applied and Environment Microbiology* 71, 7974-7979.
- Wels, M., Overmars, L., Francke, Ch., Kleerebezem, M., Siezen, R.J. 2010. Reconstruction of the regulatory network of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on basis of correlated gene expression and conserved regulatory motifs. *Microbial Biotechnology* 4, 333-344.
- Wels, M., Francke, Ch., Kerkhoven, R., Kleerebezem, M., Siezen, R.J. 2006. Predicting cis-acting elements of *Lactobacillus plantarum* by comparative genomics with different taxonomic subgroups. *Nucleic Acids Research* 34, 1947-1958.
- Wels, M., Groot Kormelink, T., Kleerebezem, M., Siezen, R.J., Francke, C. 2008. An *in silico* analysis of T-box regulated genes and T-box evolution in prokaryotes, with emphasis on prediction of substrate specificity of transporters. *BMC Genomics* 9, 330-345.
- Whitehead, K., Versalovic, J., Roos, E., Britton, R.A. 2008. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1812-1819.
- Whiting, G.C. 1975. Some biochemical and flavor aspects of lactic acid bacteria in ciders and another alcoholic beverages. En: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Whiting, G.C. y Carr, J.G. (Editores). Academic Press. London, UK. p. 69-85.



- Whiting, G.C.; Carr, J.G. 1957. Chlorogenic acid metabolism in cider fermentation. *Nature* 180, 1479.
- Whiting, G.C. y Carr, J.G. 1959. Metabolism of cinnamic acids and hydroxy-cinnamic acids by *Lactobacillus pasteurianus* var. *quinicus*. *Nature* 184, 1427-1428.
- Whiting, G.C. y Coggins, R.A. 1971. The role of quinate and shikimate in the metabolism of lactobacilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 37, 33-49.
- Winkler, J., Kao, K.C. 2011. Transcriptional analysis of *Lactobacillus brevis* to N-butanol and ferulic acid stress responses. *PLoS One* 6, e21438.
- Yasuno, T., Muneyuki, E., Yoshida, M., Kato-Yamada, Y. 2009. Modulation of nucleotide binding to the catalytic sites of thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase by subunit: implication for the role of the  $\epsilon$  subunit in ATP synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 390, 230-234.
- Yokotsuka, T., 1986. Soy sauce biochemistry. *Advances in Food Research* 30, 196–220.
- Yura, T., Kanemori, M., Morita, M. 2000. The heat shock response: regulation and function. En: *Bacterial Stress Response*. Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Editores). American Society for Microbiology. Washington DC, USA, p. 3-18.
- Zhao, W., Li, Y., Gao, P., Sun, Z., Sun, T., Zhang, H. 2011. Validation of reference genes for real-time PCR studies in gene expression levels of *Lactobacillus casei* Zhang. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38, 1279-1286.
- Zhou, M., Boekhorst, J., Christof Francke, C., Siezen, R.J. 2008. LocateP: genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC Bioinformatics* 9, 173.
- Zhou, M., Theunissen, D., Wels, M., Siezen, R.J. 2010. LAB-Secretome: a genome-scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface-associated proteins of lactic acid bacteria. *BMC Genomics* 11, 651.
- Zhu, X., Liu, W., Lametsch, R., Aarestrup, F., Shi, C., She, Q., Shi, X., Knøchel, S. 2011. Phenotypic, proteomic, and genomic characterization of a putative ABC-transporter permease involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 495-501.

## **VII. APÉNDICES**



**Apéndice A.** Genes expresados diferencialmente en *Lactobacillus plantarum* WCFS1 en presencia del ácido *p*-cumárico 1,5 mM.

| Gen ID         | Locus        | Descripción  | Categoría funcional principal COG  | Actividad o subcategoría funcional descrita                                   | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup>   | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|--|--|---|------------------------------------|----------------------------|--|------------------------------|
| <i>lp_0018</i> |              | precursor de lipoproteína, proteína OppA de unión a péptidos | Metabolismo y transporte de aminoácidos  | Transporte de membrana; Transportadores ABC; Procesos de señalización celular | 3,49                               | +                          | Anclada a lípido                       | Sec-(SPII)                   |
| <i>lp_0026</i> |              | hidrolasa superfamilia HAD                                   | Función general (por predicción)   |   | 1,86                               |                            |  |                              |
| <i>lp_0053</i> |              | proteína hipotética Lp_0053                                  | Proteína hipotética  |   | -2,25                              |                            |  |                              |
| <i>lp_0126</i> |              | regulador transcripcional de respuesta al estrés (putativo)  | Multifuncional / Transcripción<br>Mecanismos de transducción de señales              |   | 1,93                               | +                          | Anclada por extremo N-terminal (No CS) | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_0129</i> | <i>hsp1</i>  | proteína “small heat shock”                                  | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                      |   | 10,45                              |                            |  |                              |
| <i>lp_0133</i> |              | regulador transcripcional                                    | Transcripción  |   | -1,85                              |                            |  |                              |
| <i>lp_0137</i> |              | oxidoreductasa   | Producción y conversión de energía   |   | 2,31                               |                            |  |                              |
| <i>lp_0201</i> |              | precursor de lipoproteína, proteína OppA de unión a péptidos | Metabolismo y transporte de aminoácidos  | Transporte de membrana; Transportadores ABC; Procesos de señalización celular | 2,95                               |                            | Anclada a lípido                       | Sec-(SPII)                   |
| <i>lp_0202</i> |              | acetiltransferasa (putativa)                                 | Función general (por predicción)   |   | 2,22                               |                            |  |                              |
| <i>lp_0203</i> | <i>serA1</i> | fosfoglicerato deshidrogenasa                                | Multifuncional / Metabolismo de coenzimas<br>Metabolismo y transporte de aminoácidos | Metabolismo de glicina, serina y treonina                                     | 1,92                               |                            |  |                              |
| <i>lp_0205</i> | <i>pgm1</i>  | fosfoglicerato mutasa (putativa)                             | Metabolismo y transporte de carbohidratos  | Metabolismo de carbohidratos; Glucólisis / Gluconeogénesis                    | 2,15                               |                            |  |                              |
| <i>lp_0236</i> | <i>trxA1</i> | tio redoxina   | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                      | Degradación y plegamiento de proteínas y procesos asociados; Chaperonas       | 2,06                               |                            |  |                              |

| Gen ID         | Locus                          | Descripción                                   | Categoría funcional principal<br>COG      | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita  | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------------------------|---|---|---|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_0254</i> | <i>cysE</i>                    | serina O-acetiltransferasa                    | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la cisteína;<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del sulfuro   | -2,58                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0255</i> | <i>metC1</i>                   | cistationina beta-liasa                       | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la cisteína;<br>Metabolismo de glicina,<br>serina y treonina;<br>Metabolismo de la metionina;<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del nitrógeno y sulfuro;<br>Metabolismo de aminoácidos | -3,08                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0256</i> | <i>cysK</i>                    | cisteína sintasa                              | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la cisteína;<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del sulfuro<br>Metabolismo de la selenometionina o selenocisteína   | -2,71                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0262</i> | <i>treR</i>                    | regulador transcripcional                     | Transcripción                             | Factores de transcripción   | -2,67                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0263</i> | <i>treA</i>                    | alfa, alfa-fosfotrehalasa                     | Metabolismo y transporte de carbohidratos | Metabolismo del almidón y otros azúcares  | -2,61                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0264</i> | <i>pts4ABC</i>                 | beta-glucósidos PTS <sup>f</sup> , EIIABC     | Metabolismo y transporte de carbohidratos | Transporte de membrana;<br>sistema de fosfotransferasas (PTS)   | -2,42                                    | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0271</i> | <i>lpdB</i><br>( <i>vdcB</i> ) | carboxilasa de ácidos aromáticos, subunidad B | Metabolismo y transporte de coenzimas     | Metabolismo de cofactores y vitaminas;<br>Biosíntesis de ubiquinona   | -2,01                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0291</i> |                                | oxidoreductasa                                | Producción y conversión de energía        |   | 2,40                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0294</i> |                                | regulador transcripcional (putativo)          | Transcripción                             |   | 2,98                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0296</i> | <i>tagI</i>                    | ADN-3-metiladenina glicosilasa I              | Replicación, recombinación y reparación   |   | 2,22                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0302</i> |                                | proteína extracelular                         |   |   | -3,47                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0304</i> |                                | proteína extracelular                         | Biogénesis de membrana y pared celular    |   | -3,01                                    | +                             | Secretora (con CS)                      | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0339</i> |                                | transaminasa                                  | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la metionina   | 2,21                                     |                               |   |                                 |

| Gen ID         | Locus        | Descripción   | Categoría funcional principal<br>COG                            | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita   | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|---|---|--|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_0349</i> | <i>amtB</i>  | proteína de transporte de amonio  | Metabolismo y transporte de iones inorgánicos                   |  | -4,50                                    | +                             | Multi-transmembrana                     | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0399</i> | <i>brnQ1</i> | proteína transportadora de aminoácidos de cadena ramificada             | Metabolismo y transporte de aminoácidos                         |  | 2,58                                     |                               | Multi-transmembrana                     | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0433</i> |              | proteína hipotética Lp_0433   | Función general (por predicción)                                |  | 3,49                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0466</i> | <i>purR</i>  | repressor del operón purina   | Metabolismo y transporte de nucleótidos                         | Factores de transcripción  | -2,06                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0481</i> | <i>pyrG</i>  | CTP sintetasa   | Metabolismo y transporte de nucleótidos                         | Metabolismo de pirimidinas   | -2,23                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0513</i> |              | proteína hipotética Lp_0513   | Proteína hipotética   |  | 2,01                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0533</i> |              | proteína integral de membrana   | Función desconocida   |  | -2,10                                    | +                             | Multi-transmembrana                     | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0535</i> |              | proteína hipotética Lp_0535   | Multifuncional / Mecanismos de transducción de señales          |  | 3,06                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0547</i> | <i>ftsH</i>  | proteína de división celular FtsH, zinc metalopeptidasa ATP-dependiente | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas | Peptidasas;<br>Crecimiento y muerte celular;<br>Plegamiento, selección y degradación de proteínas;<br>Chaperonas | 2,01                                     | +                             | Multi-transmembrana                     | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0601</i> | <i>pepC1</i> | cisteína aminopeptidasa   | Metabolismo y transporte de aminoácidos                         | Peptidasas   | 2,15                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0617</i> | <i>nusG</i>  | proteína antiterminación de la transcripción NusG                       | Transcripción   |  | -2,26                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0618</i> |              | hidrolasa de superficie celular, unida a membrana (putativa)            | Función general (por predicción)                                |  | -2,16                                    |                               | Anclada por extremo N-terminal (No CS)  | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0620</i> | <i>rplA</i>  | L1 proteína 50S ribosomal   | Traducción  | Procesamiento de la información genética;<br>Ribosoma  | -3,83                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0622</i> | <i>rplL</i>  | L12/L7 proteína ribosomal   | Traducción  | Traducción; Familia de proteínas ribosomales   | -2,68                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0727</i> | <i>groES</i> | co-chaperonina GroES  | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas |  | 3,65 <sup>c</sup>                        |                               |   |                                 |

| Gen ID         | Locus         | Descripción   | Categoría funcional principal COG  | Actividad o subcategoría funcional descrita                                   | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|---------------|---|--|---|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_0728</i> | <i>groEL</i>  | chaperonina GroEL   | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                  |   | 3,54 <sup>c</sup>                  |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0761</i> | <i>trxB1</i>  | tioredoxina reductasa (NADPH)   | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                  | Metabolismo de pirimidinas  | 2,33                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0769</i> | <i>aad</i>    | D-alanil-D-alanina dipeptidasa  | Biogénesis de membrana y pared celular   | Peptidasas  | 2,27                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0783</i> |               | precursor de lipoproteína, proteína OppA de unión a péptidos                          | Metabolismo y transporte de aminoácidos  | Transporte de membrana; Transportadores ABC; Procesos de señalización celular | -2,08                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0786</i> | <i>clpP</i>   | proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad proteolítica                               | Multifuncional / Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas | Plegamiento, selección y degradación de proteínas; Peptidasas                 | 3,94                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0802</i> | <i>glnPH1</i> | transportador ABC de glutamina, proteína de unión al sustrato y permeasa              | Metabolismo y transporte de aminoácidos  | Transporte de membrana; Transportadores ABC; Procesos de señalización celular | -2,83                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_0803</i> | <i>glnQ1</i>  | transportador ABC de glutamina, proteína de unión al ATP                              | Metabolismo y transporte de aminoácidos  | Transporte de membrana; Transportadores ABC; Procesos de señalización celular | -2,48                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0848</i> |               | proteína transportadora   | Función general (por predicción)   | Transportadores   | -2,19                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_0861</i> |               | proteína de transporte de aminoácidos (putativa)                                      | Metabolismo y transporte de aminoácidos  |   | 3,21                               | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_0874</i> |               | proteína bifuncional: aminotransferasa de aminoácidos y 2-hidroxiácido deshidrogenasa | Metabolismo y transporte de aminoácidos  |   | 2,74                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0892</i> |               | regulador transcripcional (putativo)  | Transcripción  |   | 2,46                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_0926</i> |               | proteína integral de membrana   | Función desconocida  |   | 2,35                               | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_0927</i> |               | proteína hipotética Lp_0927   | Proteína hipotética  |   | 2,55                               |                            |                                      |                              |

| Gen ID         | Locus        | Descripción  | Categoría funcional principal<br>COG                            | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita  | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|--|---|---|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_0928</i> |              | proteína hipotética Lp_0928  | Proteína hipotética   |   | 2,40                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0929</i> | <i>asp1</i>  | proteína de choque alcalino  | Función desconocida   |   | 2,65                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0930</i> | <i>asp2</i>  | proteína de choque alcalino  | Función desconocida   |   | 2,53                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0937</i> | <i>pepN</i>  | alanina aminopeptidasa de membrana                                       | Metabolismo y transporte de aminoácidos                         | Metabolismo de glutatión;<br>Procesos de señalización celular;<br>Peptidasas                | 2,47                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0956</i> | <i>asnS1</i> | asparaginil-ARNt sintetasa   | Traducción  | Traducción; Biosíntesis de aminoacil-ARNt;<br>Metabolismo de alanina y aspartato            | 2,92                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0957</i> | <i>asnA</i>  | asparagina sintetasa AsnA  | Metabolismo y transporte de aminoácidos                         | Metabolismo de alanina y aspartato;<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del nitrógeno | 2,69                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_0984</i> |              | proteína hipotética Lp_0984  | Transcripción   |   | -2,75                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_0988</i> |              | Precursor de lipoproteína  |   |   | -2,26                                    | +                             | Anclada a lípido                        | Sec-(SPII)                      |
| <i>lp_0989</i> |              | proteína integral de membrana  |   |   | 2,99                                     | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0990</i> |              | proteína hipotética Lp_0990  | Proteína hipotética   |   | 19,47                                    |                               | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0991</i> |              | proteína transportadora multidroga                                       | Metabolismo y transporte de carbohidratos                       |   | 17,45                                    | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_0992</i> |              | proteína hipotética Lp_0992  | Transcripción   |   | 16,72                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1018</i> | <i>ctsR</i>  | regulador transcripcional de la clase III de los genes de choque térmico | Transcripción   | Factores de transcripción   | 2,43                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1019</i> | <i>clpC</i>  | proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad ClpC de unión al ATP          | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas | Degradación y plegamiento de proteínas y procesos asociados;<br>Chaperonas                  | 2,85                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1025</i> | <i>rpsL</i>  | S12 proteína 30S ribosomal   | Traducción  | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales                  | -2,15                                    |                               |   |                                 |



| Gen ID         | Locus       | Descripción                | Categoría funcional principal<br>COG | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita                             | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|-------------|----------------------------|--------------------------------------|--|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1032</i> | <i>rpsJ</i> | S10 proteína 30S ribosomal | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -4,03                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1033</i> | <i>rplC</i> | L3 proteína 50S ribosomal  | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -4,03                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1034</i> | <i>rplD</i> | L4 proteína 50S ribosomal  | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -3,67                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1035</i> | <i>rplW</i> | L23 proteína 50S ribosomal | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -4,61                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1036</i> | <i>rplB</i> | L2 proteína 50S ribosomal  | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -4,34                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1038</i> | <i>rpsS</i> | S19 proteína 30S ribosomal | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -2,99                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1039</i> | <i>rpIV</i> | L22 proteína 50S ribosomal | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -3,74                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1040</i> | <i>rpsC</i> | S3 proteína 30S ribosomal  | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -3,29                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1041</i> | <i>rplP</i> | L16 proteína 50S ribosomal | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -4,14                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1044</i> | <i>rpsQ</i> | S17 proteína 30S ribosomal | Traducción                           | Procesamiento de la información genética                                   | -3,23                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1045</i> | <i>rplN</i> | L14 proteína ribosomal     | Traducción                           | Traducción; Familia de proteínas ribosomales                               | -3,14                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1046</i> | <i>rplX</i> | L24 proteína ribosomal     | Traducción                           | Traducción; Familia de proteínas ribosomales                               | -2,92                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1047</i> | <i>rplE</i> | L5 proteína 50S ribosomal  | Traducción                           | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -2,62                                    |                               |   |                                 |

| Gen ID         | Locus        | Descripción                               | Categoría funcional principal<br>COG         | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita   | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|---|--|--|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1048</i> | <i>rpsN</i>  | S14 proteína ribosomal                    | Traducción                                   | Traducción;<br>Procesamiento de la<br>información genética; Familia<br>de proteínas ribosomales  | -2,40                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1050</i> | <i>rpsH</i>  | S8 proteína 30S ribosomal                 | Traducción                                   | Procesamiento de la<br>información genética; Familia<br>de proteínas ribosomales   | -2,84                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1051</i> | <i>rplF</i>  | L6 proteína 50S ribosomal                 | Traducción                                   | Procesamiento de la<br>información genética; Familia<br>de proteínas ribosomales   | -3,01                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1052</i> | <i>rplR</i>  | L18 proteína ribosomal                    | Traducción                                   | Traducción; Familia de<br>proteínas ribosomales  | -2,37                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1082</i> |              | malato / lactato deshidrogenasa           | Producción y conversión de<br>energía        |  | 1,98                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1083</i> | <i>tkt2</i>  | transcetolasa                             | Metabolismo y transporte de<br>carbohidratos | Biosíntesis de metabolitos<br>secundarios (policétidos<br>antimicrobianos) y péptidos<br>no ribosomales;<br>Metabolismo de<br>carbohidratos; vía de las<br>pentosas fosfato;<br>Metabolismo energético;<br>Fijación de carbono | 4,47                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1084</i> | <i>aroD1</i> | sikimato 5-dehidrogenasa                  | Metabolismo y transporte de<br>aminoácidos   | Biosíntesis de fenilalanina,<br>tirosina y triptofano  | 3,66                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1085</i> | <i>aroA</i>  | 3-deoxi-7-fosfoheptulonato sintasa        | Metabolismo y transporte de<br>aminoácidos   | Biosíntesis de fenilalanina,<br>tirosina y triptofano  | 3,31                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1086</i> | <i>aroB</i>  | 3-deshidroquinato sintasa                 | Metabolismo y transporte de<br>aminoácidos   | Biosíntesis de fenilalanina,<br>tirosina y triptofano  | 2,24                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1118</i> | <i>mleS</i>  | enzima maloláctica                        | Producción y conversión de<br>energía        | Metabolismo de carbohidratos<br>y piruvato;<br>Metabolismo energético;<br>Fijación de carbono  | 2,34                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1119</i> | <i>mleP2</i> | proteína transportadora de malato         | Función general (por predicción)             |  | 2,51                                     | +                             | Multi-trans-<br>membrana                | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1120</i> |              | proteína transportadora de<br>aminoácidos | Metabolismo y transporte de<br>aminoácidos   |  | 2,46                                     | +                             | Multi-trans-<br>membrana                | Sec-(SPI)                       |

| Gen ID         | Locus        | Descripción                                    | Categoría funcional principal<br>COG      | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita   | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|--|---|--|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1175</i> | <i>glpF4</i> | proteína facilitadora para la toma de glicerol | Metabolismo y transporte de carbohidratos |  | -3,52                                    | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1177</i> | <i>cps1A</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido        | Biogénesis de membrana y pared celular    |  | -2,12                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1178</i> | <i>cps1B</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido        | Biogénesis de membrana y pared celular    |  | -1,94                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1179</i> | <i>cps1C</i> | transportador                                  | Función general (por predicción)          |  | -2,61                                    | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1180</i> | <i>cps1D</i> | glicosiltransferasa                            |   | Metabolismo de carbohidratos: fructose y manosa,<br>Biosíntesis y metabolismo de glicanos;<br>Biosíntesis de glicosfingolípidos tipo globo-series y lacto-series<br>Biosíntesis de N- y O-glicanos<br>Metabolismo de lípidos;<br>Metabolismo de glicerol | -2,50                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1181</i> | <i>cps1E</i> | aciltransferasa/acetiltransferasa              | Metabolismo y transporte de carbohidratos |  | -2,67                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1182</i> | <i>cps1F</i> | proteína de biosíntesis de exopolisacárido     |   |  | -2,71                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1183</i> | <i>cps1G</i> | glicosiltransferasa                            | Biogénesis de membrana y pared celular    |  | -2,41                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1184</i> | <i>cps1H</i> | glicosiltransferasa (ramnosiltransferasa)      | Biogénesis de membrana y pared celular    |  | -2,96                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1185</i> | <i>cps1I</i> | polisacárido polimerasa                        |   |  | -2,03                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1187</i> |              | proteína hipotética Lp_1187                    | Proteína hipotética                       |  | -1,93                                    | +                             | Anclada por extremo N-terminal (con CS) | Sec-(SPI)                       |

| Gen ID         | Locus        | Descripción  | Categoría funcional principal COG   | Actividad o subcategoría funcional descrita  | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|--|---|--|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_1190</i> | <i>rfbD</i>  | dTDP-4-deshidroramnosil reductasa                                  | Biogénesis de membrana y pared celular  | Biosíntesis de metabolitos secundarios (policétidos antimicrobianos) y péptidos no ribosomales;<br>Metabolismo de carbohidratos;<br>Metabolismo de los azúcares de nucleótidos | -1,92                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_1219</i> | <i>glf2</i>  | UDP-galactopiranosil mutasa  | Biogénesis de membrana y pared celular  |  | -2,42                              | +                          | Sec-(SPI)                            | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_1220</i> | <i>cps3D</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido (putativa)                 |   |  | -1,90                              | +                          | Secretora (con CS)                   | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_1221</i> | <i>cps3E</i> | proteína de biosíntesis de polisacárido (putativa)                 |   |  | -2,01                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_1245</i> | <i>hicD2</i> | L-2-hidroxiisocaproato deshidrogenasa                              | Producción y conversión de energía  | Metabolismo de aminoácidos: cisteína<br>Metabolismo de carbohidratos; Glucólisis / Gluconeogénesis<br>Metabolismo de propanoato<br>Metabolismo de piruvato                     | 2,31                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_1253</i> | <i>gshR2</i> | glutathion reductasa   | Producción y conversión de energía  | Metabolismo de aminoácidos: glutamato<br>Metabolismo de glutatión  | 2,04                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_1261</i> | <i>oppA</i>  | transportador ABC de oligopéptidos, subunidad de unión al sustrato | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Transporte de membrana;<br>Transportadores ABC<br>Procesos y señalización celular  | 21,43                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_1262</i> | <i>oppB</i>  | transportador ABC de oligopéptidos, permeasa                       | Multifuncional /<br>Metabolismo y transporte de aminoácidos;<br>Metabolismo y transporte de iones inorgánicos | Transporte de membrana;<br>Transportadores ABC<br>Procesos y señalización celular  | 11,07                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |

| Gen ID         | Locus       | Descripción  | Categoría funcional principal<br>COG  | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita   | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|-------------|--|---|--|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1263</i> | <i>oppC</i> | transportador ABC de oligopéptidos, permeasa   | Multifuncional /<br>Metabolismo y transporte de aminoácidos;<br>Metabolismo y transporte de iones inorgánicos | Transporte de membrana;<br>Transportadores ABC<br>Procesos y señalización celular  | 9,91                                     | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1264</i> | <i>oppD</i> | transportador ABC de oligopéptidos, proteína de unión al ATP                                   | Multifuncional /<br>Metabolismo y transporte de aminoácidos;<br>Metabolismo y transporte de iones inorgánicos | Transporte de membrana;<br>Transportadores ABC<br>Procesos y señalización celular  | 10,29                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1265</i> | <i>oppF</i> | transportador ABC de oligopéptidos, proteína de unión al ATP                                   | Función general (por predicción)  | Transporte de membrana;<br>Transportadores ABC<br>Procesos y señalización celular  | 9,96                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1268</i> |             | integrasa/recombinasa, fragmento (putativa)  | Replicación, recombinación y reparación   |  | -2,02                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1269</i> | <i>clpE</i> | proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad ClpE de unión al ATP                                | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas   | Degradación y plegamiento de proteínas y procesos asociados;<br>Chaperonas   | 4,63                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1298</i> | <i>mmuM</i> | homocisteína metiltransferasa  | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la metionina  | 2,75                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1374</i> | <i>metH</i> | proteína bifuncional: homocisteína S-metiltransferasa / 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la metionina<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del metano;<br>Metabolismo de cofactores y vitaminas | 2,41                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1375</i> | <i>metE</i> | 5-metilentetrahidropteroil triglutamato- homocisteína S-metiltransferasa                       | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la metionina  | 2,52                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1390</i> |             | acetiltransferasa (putativa)   | Función general (por predicción)  |  | -2,14                                    | +                             |   |                                 |
| <i>lp_1391</i> | <i>argS</i> | arginil-ARNt sintetasa   | Traducción  | Traducción; Biosíntesis de aminoacil-ARNt; Metabolismo de arginina y prolina   | -1,87                                    |                               |   |                                 |

| Gen ID         | Locus | Descripción   | Categoría funcional principal COG                   | Actividad o subcategoría funcional descrita  | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|-------|---|---|--|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_1424</i> |       | oxidoreductasa (putativa)                                 | Función general (por predicción)                    | Metabolismo de glicina, serina y treonina, degradación de la lisina<br>Metabolismo de carbohidratos: frutosa, manosa y galactosa<br>Metabolismo de los azúcares de nucleótidos<br>Metabolismo de lípidos;<br>Biosíntesis de ácidos biliares<br>Metabolismo del ácido linoleico<br>Biodegradación y metabolismo de xenobióticos | 15,28                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_1425</i> |       | fumarato reductasa, subunidad precursora de flavoproteína | Multifuncional / Producción y conversión de energía | Transducción de señales: sistema de dos componentes;<br>Metabolismo de carbohidratos;<br>Metabolismo del butanoato;<br>Ciclo del citrato;<br>Metabolismo energético: fosforilación oxidativa;<br>Fijación de CO <sub>2</sub> ;<br>Biodegradación y metabolismo de xenobióticos;<br>Degradación de benzoato vía ligación al CoA | 19,72                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_1426</i> |       | proteína hipotética Lp_1426                               | Proteína hipotética                                 |  | 7,20                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_1427</i> |       | proteína hipotética Lp_1427                               | Metabolismo y transporte de nucleótidos             | Metabolismo de pirimidinas   | -1,98                              |                            |                                      |                              |

| Gen ID         | Locus       | Descripción                                      | Categoría funcional principal<br>COG    | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita   | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|-------------|--|---|--|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1500</i> | <i>narI</i> | nitrito reductasa, cadena gamma                  | Producción y conversión de energía      | Transporte de membrana;<br>Transportadores y transferencia de electrones;<br>Procesamiento de información ambiental;<br>Transducción de señales:<br>sistema de dos componentes<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del nitrógeno | -2,12                                    | +                             | Multi-transmembrana                     | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1515</i> | <i>infC</i> | factor de la iniciación de la transcripción IF-3 | Traducción                              | Factores de traducción   | -2,91                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1516</i> | <i>rpmI</i> | L35 proteína ribosomal                           | Traducción                              | Traducción; Familia de proteínas ribosomales   | -2,07                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1517</i> | <i>rplT</i> | L20 proteína 50S ribosomal                       | Traducción                              | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales   | -2,07                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1549</i> | <i>sbcD</i> | exonucleasa SbcD                                 | Replicación, recombinación y reparación |  | 1,90                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1552</i> |             | proteína integral de membrana                    |   |  | 1,91                                     | +                             | Multi-transmembrana                     | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1580</i> | <i>glnR</i> | repressor de la glutamina sintetasa              | Transcripción                           | Factores de transcripción  | -1,97                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1581</i> | <i>glnA</i> | glutamato-amonio ligasa /glutamina sintetasa     | Metabolismo y transporte de aminoácidos | Transducción de señales:<br>sistema de dos componentes;<br>Metabolismo de glutamato;<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del nitrógeno<br>Biosíntesis y metabolismo de glicanos:<br>Biosíntesis del peptidoglicano               | -1,96                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1590</i> |             | proteína integral de membrana                    |   |  | 3,44                                     | +                             | Intracelular/<br>TMH luego de 60°C      |                                 |
| <i>lp_1638</i> | <i>rimM</i> | proteína de procesamiento del 16S ARNr           | Traducción                              |  | -2,26                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1639</i> | <i>trmD</i> | ARNt (guanina-N1-)-metiltransferasa              | Traducción                              | Metabolismo de lípidos;<br>Biosíntesis de esteroides   | -2,55                                    |                               |   |                                 |

| Gen ID         | Locus        | Descripción   | Categoría funcional principal<br>COG  | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita   | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|---|---|--|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1640</i> | <i>rplS</i>  | L19 proteína 50S ribosomal  | Traducción  | Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales   | -2,13                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1670</i> | <i>fabZ1</i> | (3R)-hidroximiristoil-(proteína acil-transportadora) deshidratasa                   | Metabolismo y transporte de lípidos   | Biosíntesis de ácidos grasos   | -3,97                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1671</i> | <i>fabH2</i> | 3-oxoacil-(proteína acil-transportadora) sintasa III                                | Metabolismo y transporte de lípidos   | Biosíntesis de ácidos grasos   | -3,97                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1672</i> | <i>acpA2</i> | proteína acil-transportadora  | Multifuncional / Metabolismo de lípidos / Biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios                                    | Biosíntesis de ácidos grasos   | -3,69                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1673</i> | <i>fabD</i>  | (proteína acil-transportadora) S-maloniltransferasa                                 | Metabolismo y transporte de lípidos   | Biosíntesis de ácidos grasos   | -3,63                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1674</i> | <i>fabG1</i> | 3-oxoacil-(proteína acil-transportadora) reductasa                                  | Multifuncional / Metabolismo de lípidos / Función general (por predicción) / Biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios | Biosíntesis de ácidos grasos   | -2,97                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1675</i> | <i>fabF</i>  | 3-oxoacil-(proteína acil-transportadora) sintasa II                                 | Multifuncional / Metabolismo de lípidos / Biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios                                    | Biosíntesis de ácidos grasos   | -2,82                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1676</i> | <i>accB2</i> | acetil-CoA carboxilasa, proteína transportadora de carboxi-biotina                  | Metabolismo y transporte de lípidos   | Biosíntesis de metabolitos secundarios (antimicrobianos); Metabolismo de carbohidratos; Metabolismo de propanoato; Metabolismo de piruvato<br>Biosíntesis de ácidos grasos | -2,33                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1677</i> | <i>fabZ2</i> | (3R)-hidroximiristoil-3-hidroxidecanoil-(proteína acil-transportadora) deshidratasa | Metabolismo y transporte de lípidos   | Biosíntesis de ácidos grasos   | -2,52                                    |                               |   |                                 |



| Gen ID         | Locus        | Descripción   | Categoría funcional principal<br>COG                            | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita                    | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|---|---|---|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1706</i> |              | proteína integral de membrana                                   |   |   | 2,35                                     | +                             | Multi-trans-<br>membrana                | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1721</i> |              | 4-aminobutirato aminotransferasa                                | Metabolismo y transporte de aminoácidos                         | Metabolismo de alanina y aspartato                                | 2,02                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1744</i> |              | transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión al ATP      | Metabolismo y transporte de iones inorgánicos                   | Procesamiento de la información ambiental;<br>Transportadores ABC | 2,57                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1745</i> |              | transportador ABC de aminoácidos, permeasa                      | Metabolismo y transporte de iones inorgánicos                   | Procesamiento de la información ambiental;<br>Transportadores ABC | 2,44                                     | +                             | Multi-trans-<br>membrana                | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1746</i> |              | transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión al sustrato | Metabolismo y transporte de iones inorgánicos                   | Procesamiento de la información ambiental;<br>Transportadores ABC | 3,53                                     | +                             | Anclado por extremo N-terminal (no CS)  | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1750</i> |              | transportador ABC, proteína de unión al ATP                     | Metabolismo y transporte de aminoácidos                         | Transportadores ABC   | -2,08                                    |                               |   |                                 |
| <i>lp_1764</i> |              | bacteriocina (putativa)   | Mecanismos de defensa   |   | 2,32                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1765</i> |              | proteína hipotética Lp_1765                                     | Proteína hipotética   |   | 2,66                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1766</i> |              | proteína hipotética Lp_1766                                     | Proteína hipotética   |   | 2,29                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1770</i> |              | proteína transportadora   |   | Transporte de membrana;<br>Transportadores ABC                    | 2,83                                     | +                             | Multi-trans-<br>membrana                | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1771</i> |              | transportador ABC, proteína de unión al ATP                     | Metabolismo y transporte de iones inorgánicos                   | Procesamiento de la información ambiental;<br>Transportadores ABC | 2,85                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1803</i> |              | proteína transportadora   | Metabolismo y transporte de carbohidratos                       |   | 2,02                                     | +                             | Multi-trans-<br>membrana                | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1812</i> |              | precursor de lipoproteína (putativo)                            |   |   | 2,21                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1835</i> | <i>msrA2</i> | proteína-metionina-S-óxido reductasa                            | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas |   | 2,12                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1836</i> | <i>msrA3</i> | metionina sulfóxido reductasa B                                 | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas |   | 2,10                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1863</i> |              | proteína transportadora   | Metabolismo y transporte de carbohidratos                       |   | -2,22                                    | +                             | Multi-trans-<br>membrana                | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1901</i> |              | proteína hipotética Lp_1901                                     | Proteína hipotética   |   | 2,49                                     |                               |   |                                 |

| Gen ID         | Locus        | Descripción   | Categoría funcional principal<br>COG   | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita                                    | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup> | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|---|--|---|--|-------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>lp_1903</i> | <i>clpB</i>  | proteasa Clp dependiente de ATP, subunidad ClpB de unión al ATP | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                              | Degradación y plegamiento de proteínas y procesos asociados;<br>Chaperonas        | 3,81                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1908</i> |              | proteína integral de membrana                                   | Biogénesis de membrana y pared celular   |   | 2,33                                     | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1918</i> |              | oxidoreductasa  | Multifuncional /<br>Función general (por predicción) /<br>Producción y conversión de energía |   | 2,12                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1939</i> |              | oxidoreductasa  | Multifuncional /<br>Función general (por predicción) /<br>Producción y conversión de energía |   | 2,02                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1948</i> |              | regulador transcripcional                                       | Transcripción  |   | 3,20                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_1949</i> |              | proteína integral de membrana                                   | Función desconocida  |   | 3,26                                     | +                             | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_1979</i> | <i>msrA4</i> | proteína-metionina-S-óxido reductasa                            | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                              |   | 2,70                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_2026</i> | <i>dnaJ</i>  | chaperona DnaJ  | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                              |   | 1.77 <sup>c</sup>                        |                               |   |                                 |
| <i>lp_2027</i> | <i>dnaK</i>  | chaperona molecular DnaK  | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                              |   | 2.67 <sup>c</sup>                        |                               |   |                                 |
| <i>lp_2028</i> | <i>grpE</i>  | proteína de choque térmico GrpE                                 | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                              |   | 3.05 <sup>c</sup>                        |                               |   |                                 |
| <i>lp_2029</i> | <i>hrcA</i>  | represor de la transcripción inducible por calor                | Transcripción  | Factores de transcritption  | 3,01                                     |                               |   |                                 |
| <i>lp_2033</i> | <i>arol</i>  | sikimato quinasa  | Metabolismo y transporte de aminoácidos  | Metabolismo de aminoácidos;<br>Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptofano | 3,84                                     |                               |   |                                 |

| Gen ID         | Locus              | Descripción                                   | Categoría funcional principal COG   | Actividad o subcategoría funcional descrita  | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------------|---|---|--|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_2034</i> | <i>tyrA</i>        | prefenato dehidrogenasa                       | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptofano<br>Biosíntesis de metabolitos secundarios (antimicrobianos) | 5,14                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2035</i> | <i>aroE</i>        | 3-fosfosikimato 1-carboxiviniltransferasa     | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptofano   | 6,04                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2036</i> |                    | proteína hipotética Lp_2036                   | Proteína hipotética   |  | 5,95                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2037</i> | <i>aroF</i>        | corismato sintasa                             | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptofano   | 5,10                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2038</i> |                    | proteína transportadora                       | Metabolismo y transporte de aminoácidos   |  | 3,48                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2056</i> |                    | hidrolasa de la superfamilia HAD              | Función general (por predicción)  |  | -2,25                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2077</i> |                    | transportador ABC de nitrato, permeasa        | Metabolismo y transporte de iones inorgánicos   | Transporte de membrana; Transportadores ABC; Procesos de señalización celular                                  | 2,48                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2095</i> | <i>fruR</i>        | regulador transcripcional del operón fructosa | Multifuncional / Metabolismo y transporte de carbohidratos  | Factores de transcripción  | -2,17                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2096</i> | <i>fruK</i>        | 1-fosfofructoquinasa                          | Metabolismo y transporte de carbohidratos   | Metabolismo de carbohidratos: fructosa y manosa  | -2,13                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2097</i> | <i>pts16ABC</i>    | pts16ABC fructosa PTS                         | Metabolismo y transporte de carbohidratos   | Transporte de membrana; sistema de fosfotransferasas (PTS)<br>Procesos y señalización celular; Transportadores | -2,34                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2101</i> | <i>cps4H</i>       | polisacárido polimerasa                       |   |  | -1,89                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2102</i> | <i>cps4G</i>       | glicosiltransferasa                           | Biogénesis de membrana y pared celular  |  | -1,84                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2103</i> | <i>cps4F</i>       | glicosiltransferasa                           | Biogénesis de membrana y pared celular  |  | -2,35                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2105</i> | <i>galE3/cps4D</i> | UDP-glucosa 4-epimerasa                       | Multifuncional / Biogénesis de membrana y pared celular / Metabolismo y transporte de carbohidratos | Metabolismo de carbohidratos: galactosa; Metabolismo de los azúcares de nucleótidos                            | -2,25                              |                            |                                      |                              |

| Gen ID         | Locus         | Descripción  | Categoría funcional principal COG   | Actividad o subcategoría funcional descrita  | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|---------------|--|---|--|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_2106</i> | <i>cps4C</i>  | proteína de biosíntesis de exopolisacárido                               | Multifuncional / Biogénesis de membrana y pared celular / Metabolismo y transporte de carbohidratos |  | -2,30                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2108</i> | <i>cps4A</i>  | proteína de biosíntesis de exopolisacárido                               | Biogénesis de membrana y pared celular  |  | -2,17                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2109</i> | <i>uvrC</i>   | endonucleasa ABC de escisión, subunidad C                                | Replicación, recombinación y reparación   |  | 2,06                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2110</i> | <i>glnQ3</i>  | transportador ABC de glutamina, proteína de unión al ATP                 | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Transporte de membrana; Transportadores ABC<br>Procesos y señalización celular         | -2,46                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2111</i> | <i>glnPH2</i> | transportador ABC de glutamina, proteína de unión al sustrato y permeasa | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Transporte de membrana; Transportadores ABC<br>Procesos y señalización celular         | -2,50                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2113</i> |               | proteína hipotética Lp_2113  | Proteína hipotética   |  | 2,48                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2125</i> | <i>rpsO</i>   | proteína ribosomalS15  | Traducción  | Traducción; Procesamiento de la información genética; Familia de proteínas ribosomales | -2,16                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2213</i> | <i>brnQ2</i>  | proteína transportadora de aminoácidos de cadena ramificada              | Metabolismo y transporte de aminoácidos   |  | -2,22                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2230</i> |               | proteína hipotética Lp_2230  | Función general (por predicción)  |  | 1,88                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2240</i> |               | proteína transportadora de aminoácidos                                   | Metabolismo y transporte de aminoácidos   |  | -2,59                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2276</i> |               | proteína hipotética Lp_2276  | Proteína hipotética   |  | -2,31                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2323</i> | <i>tpx</i>    | tiol peroxidasa  | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas                                     |  | 2,02                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2393</i> |               | precursor de lipoproteína  |   |  | 10,23                              |                            |                                      |                              |

| Gen ID         | Locus           | Descripción  | Categoría funcional principal COG         | Actividad o subcategoría funcional descrita   | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|-----------------|--|---|---|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_2394</i> |                 | transportador ABC, proteína de unión al ATP y permeasa                             | Mecanismos de defensa                     | Procesamiento de la información ambiental; Transportadores multidrogas tipo ABC                               | 8,75                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2395</i> |                 | transportador ABC, proteína de unión al ATP y permeasa                             | Mecanismos de defensa                     | Procesamiento de la información ambiental; ABC multidrug transportadores                                      | 9,80                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2464</i> |                 | proteína fágica similar a la proteína portal o conectora (prophage P2b protein 17) | Función desconocida                       |   | 2,64                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2503</i> |                 | proteína transportadora de azúcar  | Metabolismo y transporte de carbohidratos |   | -1,98                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2509</i> |                 | proteína transportadora  | Función general (por predicción)          |   | -2,47                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2512</i> |                 | proteína integral de membrana  | Función desconocida                       |   | 2,23                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2521</i> |                 | regulador transcripcional tipo AsnC  | Transcripción                             | Factores de transcripción   | 2,32                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2531</i> | <i>pts18CBA</i> | N-acetilglucosamina y glucosa PTS, EIICBA  | Metabolismo y transporte de carbohidratos | Transporte de membrana; Sistema de fosfotransferasas (PTS); Procesos de señalización celular; Transportadores | -1,89                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2532</i> | <i>panE1</i>    | 2-deshidropantoato 2-reductasa   | Metabolismo y transporte de coenzimas     | Metabolismo de cofactores y vitaminas; Biosíntesis de pantotenato y CoA                                       | 2,23                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2535</i> | <i>hom1</i>     | homoserina deshidrogenasa  | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de glicina, serina y treonina; Biosíntesis de lisina  | 1,97                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2536</i> | <i>metY</i>     | O-acetilhomoserina (tiol)-liasa  | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la cisteína y metionina  | 3,18                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2537</i> | <i>metA</i>     | metA homoserina O-succiniltransferasa  | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la metionina; Metabolismo energético; Metabolismo del sulfuro                                  | 3,59                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2586</i> |                 | hidrolasa de superficie celular, unida a membrana (putativa)                       | Función general (por predicción)          |   | 1,94                               | +                          | Anclado por extremo N-terminal noCS  | Sec-(SPI)                    |

| Gen ID         | Locus        | Descripción                                  | Categoría funcional principal COG   | Actividad o subcategoría funcional descrita  | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|--|---|--|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_2634</i> | <i>metB</i>  | O-succinilhomoserina (tiol)-liasa            | Metabolismo y transporte de aminoácidos   | Metabolismo de la cisteína y metionina   | 2,33                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2658</i> |              | glicosiltransferasa (putativa)               | Biogénesis de membrana y pared celular  |  | 3,36                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2659</i> | <i>xpkI</i>  | fosfoquetolasa putativa                      | Metabolismo y transporte de carbohidratos   | Metabolismo de la tirosina; Metabolismo de carbohidratos; vía de las pentosas fosfato<br>Metabolismo de propanoato; Metabolismo de piruvato<br>Metabolismo energético; Fijación de carbono | 1,99                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2698</i> | <i>pyrF</i>  | orotidina-5'-fosfato descarboxilasa          | Metabolismo y transporte de nucleótidos   | Metabolismo de pirimidinas   | -2,04                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2699</i> | <i>pyrD</i>  | dihidroorotato deshidrogenasa 1B             | Metabolismo y transporte de nucleótidos   | Metabolismo de pirimidinas   | -1,99                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2700</i> | <i>carB</i>  | carbamoil fosfato sintasa, sudunidad grande  | Multifuncional / Metabolismo y transporte de aminoácidos<br>Metabolismo y transporte de nucleótidos | Metabolismo del glutamato; Metabolismo de pirimidinas  | -2,18                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2701</i> | <i>pyrAA</i> | carbamoil fosfato sintasa, sudunidad pequeña | Multifuncional / Metabolismo y transporte de aminoácidos<br>Metabolismo y transporte de nucleótidos | Metabolismo del glutamato; Metabolismo de pirimidinas  | -2,06                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2708</i> | <i>pucR</i>  | regulador del transporte de purinas          | Multifuncional / Biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios                   | Factores de transcripción  | 5,57                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2710</i> | <i>pucK</i>  | proteína transportadora de xantina / uracilo | Metabolismo y transporte de nucleótidos   |  | -2,12                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2712</i> |              | xantina/uracilo permeasa                     | Función general (por predicción)  | Transportadores  | -2,70                              | +                          | Multi-trans-membrana                 | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2739</i> |              | transportador ABC, proteína de unión al ATP  | Mecanismos de defensa   | Procesamiento de la información ambiental; Transportadores ABC   | -2,72                              |                            |                                      |                              |

| Gen ID         | Locus        | Descripción  | Categoría funcional principal COG                                | Actividad o subcategoría funcional descrita                                     | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|--|--|---|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_2740</i> |              | transportador ABC, permeasa                            | Biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios | Procesamiento de la información ambiental; Transportadores ABC                  | -2,00                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2771</i> | <i>natC2</i> | nicotinato fosforibosiltransferasa                     | Metabolismo y transporte de coenzimas                            | Metabolismo de cofactores y vitaminas (nicotinato y nicotinamida)               | 2,45                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2788</i> |              | 2-deshidropantoato 2-reductasa                         | Metabolismo y transporte de coenzimas                            | Metabolismo de cofactores y vitaminas (pantotenato y CoA)                       | 2,52                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2799</i> |              | proteína transportadora de aminoácidos                 | Metabolismo y transporte de aminoácidos                          |   | -5,45                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2804</i> |              | regulador transcripcional                              | Transcripción  |   | 3,79                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2809</i> |              | proteína hipotética Lp_2809                            | Proteína hipotética  |   | -1,97                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2810</i> |              | lisina (proteína involucrada en lisis celular)         | Biogénesis de membrana y pared celular                           |   | -2,00                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2820</i> |              | proteína integral de membrana                          | Función desconocida  |   | 1,91                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2830</i> | <i>aspA</i>  | aspartato amonio-liasa                                 | Metabolismo y transporte de aminoácidos                          | Metabolismo de alanina y aspartato  | -2,07                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2845</i> |              | proteína extracelular                                  |  |   | -1,91                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2893</i> |              | transportador ABC, proteína de unión al ATP y permeasa | Mecanismos de defensa  | Procesamiento de la información ambiental; Transportadores multidrogas tipo ABC | 2,18                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2894</i> |              | transportador ABC, proteína de unión al ATP y permeasa | Mecanismos de defensa  | Procesamiento de la información ambiental; Transportadores multidrogas tipo ABC | 2,38                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2921</i> |              | proteína integral de membrana                          | Función general (por predicción)                                 | Procesos de señalización celular; Transportadores                               | 2,16                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2922</i> | <i>npp</i>   | nucleótido pirofosfatasa (putativa)                    | Función general (por predicción)                                 |   | 2,36                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_2939</i> |              | proteína hipotética Lp_2939                            | Proteína hipotética  |   | -1,94                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_2948</i> |              | proteína hipotética Lp_2948                            | Función desconocida  |   | -1,95                              | +                          | Intracelular / TMH luego de 60°C     |                              |

| Gen ID         | Locus         | Descripción   | Categoría funcional principal<br>COG                   | Actividad o subcategoría<br>funcional descrita  | Magnitud<br>del<br>cambio <sup>a,b</sup> | Dominio<br>TMHMM <sup>d</sup> | Localización<br>subcelular <sup>e</sup>          | Ruta<br>metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|---------------|---|--|---|--|-------------------------------|--|---------------------------------|
| <i>lp_2949</i> |               | proteína integral de membrana   |  |   | -2,07                                    | +                             | Multi-trans-<br>membrana                         | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_2953</i> |               | esterasa (putativa)   | Multifuncional / Función<br>general (por predicción)   |   | 1,85                                     |                               |  |                                 |
| <i>lp_2960</i> |               | lipasa/esterasa, subfamilia de las<br>SGNH-hidrolasas   |  | Actividad hidrolasa   | -1,98                                    |                               |  |                                 |
| <i>lp_2964</i> |               | regulador transcripcional (putativo)  | Transcripción  |   | 2,38                                     |                               |  |                                 |
| <i>lp_2993</i> |               | proteína hipotética Lp_2993   | Mecanismos de transducción de<br>señales               |   | 2,06                                     |                               |  |                                 |
| <i>lp_3014</i> |               | proteína extracelular   | Biogénesis de membrana y pared<br>celular              |   | -4,29                                    | +                             | Anclado por<br>extremo N-<br>terminal<br>(no CS) | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_3015</i> |               | proteína extracelular   | Biogénesis de membrana y pared<br>celular              |   | -5,07                                    | +                             | Secretora<br>(con CS)                            | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_3049</i> |               | proteína de transporte de amino<br>ácidos   | Metabolismo y transporte de<br>aminoácidos             |   | -4,57                                    | +                             | Multi-trans-<br>membrana                         | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_3085</i> | <i>asnB2</i>  | asparagina sintasa (glutamina-<br>hidrolizante)   | Metabolismo y transporte de<br>aminoácidos             | Metabolismo de alanina y<br>aspartato<br>Metabolismo energético;<br>Metabolismo del nitrógeno | -2,75                                    |                               |  |                                 |
| <i>lp_3088</i> | <i>hpk10</i>  | proteína histidina quinasa; sensor  | Mecanismos de transducción de<br>señales               | Transducción de señales:<br>sistema de dos componentes<br>Procesos y señalización<br>celular  | -2,13                                    | +                             | Multi-trans-<br>membrana                         | Sec-(SPI)                       |
| <i>lp_3125</i> |               | fumarato reductasa, subunidad<br>precursora de la flavoproteína,<br>truncada en el N-terminal | Multifuncional / Producción y<br>conversión de energía |   | 4,02                                     |                               |  |                                 |
| <i>lp_3128</i> |               | proteína de unión al ADN inducida<br>por estrés   | Metabolismo y transporte de<br>iones inorgánicos       |   | 2,03                                     |                               |  |                                 |
| <i>lp_3150</i> |               | malate deshidrogenasa (putativa)  | Producción y conversión de<br>energía                  |   | 2,38                                     |                               |  |                                 |
| <i>lp_3151</i> | <i>acm3-N</i> | hidrolasa de pared celular /<br>muramidasa, fragmento N-terminal                              | Función desconocida                                    |   | 2,40                                     |                               |  |                                 |
| <i>lp_3169</i> |               | proteína hipotética Lp_3169   | Proteína hipotética                                    |   | -1,98                                    |                               |  |                                 |



| Gen ID         | Locus       | Descripción   | Categoría funcional principal COG  | Actividad o subcategoría funcional descrita   | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup> | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|-------------|---|--|---|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <i>lp_3204</i> | <i>nupC</i> | proteína transportadora de nucleósidos                          | Metabolismo y transporte de nucleótidos                                  |   | -1,87                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_3207</i> |             | aminotransferasa  | Multifuncional / Metabolismo y transporte de aminoácidos / Transcripción |   | -2,48                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3214</i> |             | transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión al sustrato | Multifuncional / Metabolismo y transporte de aminoácidos                 | Procesamiento de la información ambiental; Transportadores ABC  | 2,68                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3255</i> | <i>lrgB</i> | hidrolasa efectora de mureína (putativa)                        | Biogénesis de membrana y pared celular                                   | Transducción de señales: sistema de dos componentes   | -2,20                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_3269</i> | <i>purB</i> | adenilosuccinato liasa  | Multifuncional / Metabolismo y transporte de nucleótidos                 | Metabolismo de alanina y aspartato; Metabolismo de purinas; Plegamiento, selección y degradación de proteínas; Chaperonas | -2,34                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3270</i> | <i>purA</i> | adenilosuccinato sintasa  | Metabolismo y transporte de nucleótidos                                  | Metabolismo de alanina y aspartato<br>Metabolismo de purinas  | -2,42                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3271</i> | <i>guaC</i> | guanosina 5'-monofosfato reductasa                              | Metabolismo y transporte de nucleótidos                                  | Metabolismo de purinas  | -2,14                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3322</i> |             | proteína hipotética Lp_3322                                     | Mecanismos de transducción de señales                                    |   | 1,96                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3324</i> |             | proteína transportadora de glicina betaina/carnitina/colina     | Biogénesis de membrana y pared celular                                   |   | -2,21                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_3334</i> | <i>adeC</i> | adenina deaminasa   | Metabolismo y transporte de nucleótidos                                  | Metabolismo de purinas  | -2,20                              |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3337</i> |             | proteína hipotética Lp_3337                                     | Proteína hipotética  |   | 3,24                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3338</i> | <i>nha2</i> | antiporter Na(+)/H(+)   | Producción y conversión de energía                                       |   | 3,77                               | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_3352</i> | <i>hsp3</i> | proteína "small heat shock"                                     | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas          |   | 4,23                               |                            |                                      |                              |
| <i>lp_3358</i> |             | proteína transportadora   | Multifuncional / Función general (por predicción)                        |   | -2,72                              | +                          | Multi-transmembrana                  | Sec-(SPI)                    |

| Gen ID         | Locus        | Descripción  | Categoría funcional principal COG                                | Actividad o subcategoría funcional descrita                             | Magnitud del cambio <sup>a,b</sup> | Dominio TMHMM <sup>d</sup> | Localización subcelular <sup>e</sup>    | Ruta metabólica <sup>e</sup> |
|----------------|--------------|--|--|---|------------------------------------|----------------------------|---|------------------------------|
| <i>lp_3394</i> |              | proteína hipotética Lp_3394  | Proteína hipotética  |   | -2,70                              |                            |   |                              |
| <i>lp_3403</i> |              | proteína transportadora  | Función general (por predicción)                                 |   | 2,87                               |                            |   |                              |
| <i>lp_3421</i> |              | proteína extracelular, gamma-D-glutamato meso-diaminopimelato muropeptidasa (putativa) | Biogénesis de membrana y pared celular                           |   | -2,64                              |                            | Anclado por extremo N-terminal (con CS) | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_3437</i> | <i>trxA3</i> | tioredoxina  | Modificación postraduccional, recambio de proteínas, chaperonas  | Degradación y plegamiento de proteínas y procesos asociados; Chaperonas | 2,12                               |                            |   |                              |
| <i>lp_3438</i> |              | proteína hipotética Lp_3438  | Función desconocida  |   | 2,11                               |                            |   |                              |
| <i>lp_3466</i> | <i>brnQ3</i> | proteína transportadora de aminoácidos de cadena ramificada                            | Metabolismo y transporte de aminoácidos                          |   | 2,21                               | +                          | Multi-trans-membrana                    | Sec-(SPI)                    |
| <i>lp_3490</i> |              | proteína de unión al FMN   |  |   | 2,49                               |                            |   |                              |
| <i>lp_3572</i> |              | oxidoreductasa   | Función general (por predicción)                                 |   | 2,01                               |                            |   |                              |
| <i>lp_3663</i> |              | proteína hipotética Lp_3663, familia de proteínas de estrés universal UspA             | Mecanismos de transducción de señales                            |   | 2,11                               |                            |   |                              |
| <i>lp_3664</i> | <i>padR</i>  | regulador del metabolismo de los ácidos fenólicos, PadR                                | Transcripción  |   | 3,86                               |                            |   |                              |
| <i>lp_3665</i> | <i>pdC</i>   | descarboxilasa del ácido <i>p</i> -cumárico  | Biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios |   | 112,09                             |                            |   |                              |
| <i>lp_3669</i> |              | proteína de la familia DegV  | Función desconocida  |   | -2,06                              |                            |   |                              |
| <i>lp_3684</i> |              | proteína hipotética Lp_3684  | Biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios |   | 2,02                               |                            |   |                              |

<sup>a</sup> Magnitud del cambio en número de veces en cultivos crecidos en medio MRS suplementado con ácido *p*-cumárico 1,5 mM en relación a cultivos sin suplementar.

<sup>b</sup> Ratios cuyo cambio fue >1,5 veces (tanto en incremento o disminución) fueron expresados diferencialmente con una FDR menor al 5% ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>c</sup> Valores significativos a  $0,05 < \text{FDR} \leq 0,1$ ;  $p < 0,05$ .

<sup>d</sup> Basado en el modelo oculto de Markov TMHMM (“TransMembrane Hidden Markov Model” por sus siglas en inglés) (Krogh *et al.*, 2001).

<sup>e</sup> Base de datos LocateP (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>) CS: Sitio de escisión (CleavageSite); Sec-(SPI): Vía secretora I; Sec-(SPII): Vía secretora II (Zhou *et al.*, 2008).

<sup>f</sup> PTS: sistema de fosfotransferasas (por sus siglas en inglés).