

# Oleica Starter<sup>®</sup> *Vegetable*

## ESPECIFICACIÓN TÉCNICA DEL PRODUCTO

Documento actualizado - Updated document 03/01/2022

## Descripción

*L. pentosus* LPG1, también conocido por los taxónomos como *Lactiplantibacillus pentosus* LPG1, es una cepa de bacteria láctica que procede de los biofilms de fermentaciones de aceitunas de mesa, aislada por investigadores del Instituto de la Grasa (CSIC) tras años de estudios. Esta bacteria fue seleccionada entre una colección de más de 600 aislados por su alto potencial tecnológico y probiótico y ha sido protegida intelectualmente por la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Si quieres conocer más sobre los investigadores que lo aislaron y estudiaron, pulsa sobre el siguiente link:

<https://www.ig.csic.es/interacciones-bacterias-lacticas-levaduras-en-alimentos/>.

*L. pentosus* es un fermento de origen vegetal que se utiliza habitualmente para elaborar aceitunas de mesa. Al contrario que muchos otros probióticos que se han aislado de la microbiota intestinal humana (como son las heces de bebés menores de 3 meses de edad), o del suelo (esporas del género *Bacillus*), *L. pentosus* es un fermento natural en el que se ha demostrado que, además de su elevado potencial tecnológico, también tiene importantes **propiedades probióticas**. La singularidad de esta cepa ha quedado reflejada en su aparición en diferentes notas de prensa en EuropaPress, Forbes, La Vanguardia Digital, etc.

## Instrucciones y recomendaciones de uso

- Medir pH y sal de la salmuera de fermentación. Óptimo de inoculación pH 6,0-8,0 y sal no superior a 6,0-7,0°Be. No inocular a temperaturas inferiores a 18°C. Si la aceituna está muy madura, se recomienda la adición de azúcar al fermentador. Inocular dentro de la primera semana de fermentación.
- Cultivo de uso directo especialmente adaptado para su inoculación en salmuera sin necesidad de medio de reconstitución. Retirar aproximadamente 5 L de salmuera del fermentador en un cubo y verter la totalidad del contenido del sobre termosellado de inóculo. Homogenizar con una varilla.
- Realizar la inoculación dentro de los primeros 30-60 minutos (90- 100% viabilidad). La viabilidad todavía se mantiene alta dentro de un periodo que puede llegar hasta las 6 horas (facilita las labores de inoculación en planta).
- Añadir la totalidad del inóculo rehidratado en el centro del fermentador y homogenizar la salmuera si es posible durante 10 minutos.
- El contenido del sobre es suficiente para inocular un fermentador de 10 toneladas de aceitunas (16.000L volumen) a una concentración superior a  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL, lo que garantiza su adecuada implantación. Respetar la dosis de inoculación para una adecuada fermentación ácido-láctica.

## **Composición y contenido**

Sobres termosellados que contienen 75 g de un liófilo concentrado compuesto por una mezcla de las cepas *L. pentosus* LPG1, *L. pentosus* 13B4 y *L. pentosus* 119 a una concentración final > 10<sup>12</sup> UFC. Como excipiente se ha utilizado dextrosa alimentaria y sacarosa. Como agente antiaglomerante se ha añadido E551. Las cepas fueron aisladas de biofilms de epidermis de aceitunas de mesa durante el proceso de fermentación.

## **Conservación y vida útil**

El envase se puede conservar 12 meses a -18° C y 12 meses en refrigeración (4° C) en su embalaje original y protegido de la luz y sustancias corrosivas sin que los microorganismos pierdan viabilidad. Una vez abierto el envase, proceder a su reconstitución en el menor tiempo posible.

## **Información sobre OGMs**

Las cepas que contiene el liófilo son bacterias lácticas aisladas de fermentaciones vegetales, por lo que son consideradas microorganismos La nueva generación de cultivos iniciadores GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA y como QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA. Este producto no contiene microorganismos modificados genéticamente (OGM) de acuerdo con los reglamentos 1829/2003 y 1830/2003 y está libre de agentes de transmisión de encefalopatía esponfiforme bovina (BSE).

Alérgenos según RE 1169/2011

	AUSENCIA	PRESENCIA
Cereales que contengan gluten y derivados	X	
Crustáceos y productos a base de crustáceos	X	
Huevos y productos a base de huevos	X	
Pescado y productos a base de pescado	X	
Cacahuets y productos a base de cacahuets	X	
Soja y productos a base de soja	X	
Leche y sus derivados (incluída lactosa)	X	
Frutos secos con cáscara y sus derivados	X	
Apio y productos derivados	X	
Mostaza y productos derivados	X	
Sésamo y productos a base de sésamo	X	
Anhídrido sulfuroso y sulfitos (> 10 mg/kg o > 10 mg/l)	X	
Altramuces y sus derivados	X	
Moluscos y sus derivados	X	

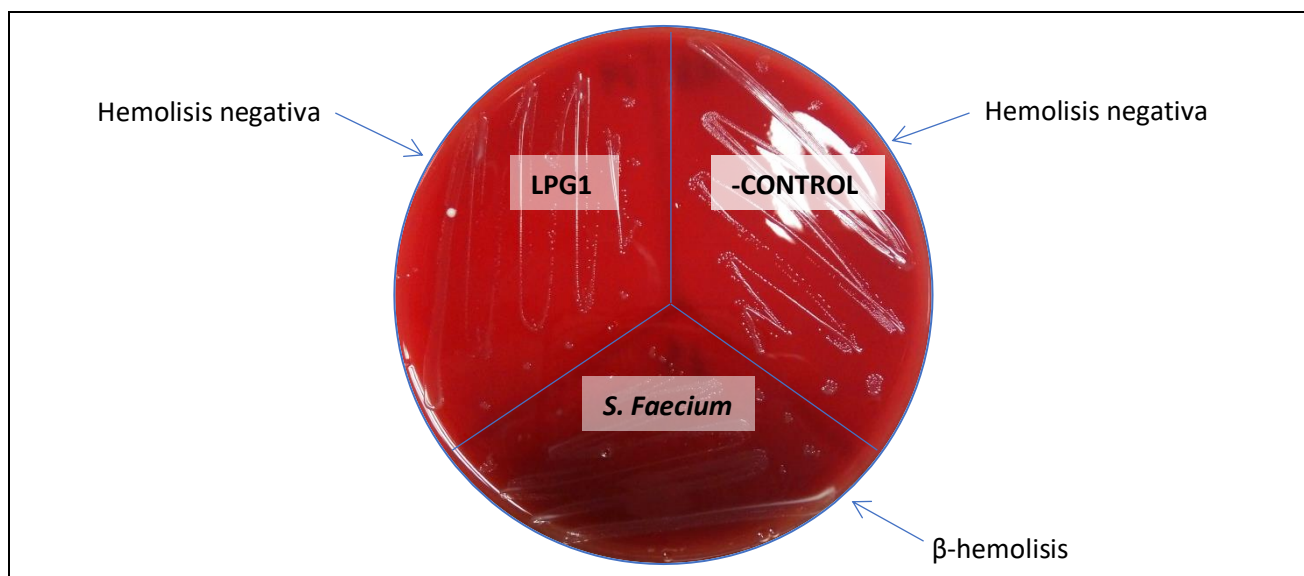
Controles microbiológicos

	RESULTADOS	ESPECIFICACIONES
Concentración celular total (ufc/bolsa)	1,0 x 10E12	≥1,0 X 10E12
Hongos y levaduras (ufc/g)	< 10	< 100
Salmonelas (ufc/25 g)	Ausencia	Ausencia / 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i> (ufc/25 g)	Ausencia	Ausencia / 25 g
Enterobacterias (ufc/g)	< 10	< 100
<i>Staphylococcus coagulasa positivo</i> (ufc/g)	Ausencia	Ausencia / g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ufc/g)	Ausencia	Ausencia / g
Clostridios sulfito reductores (ufc/g)	Ausencia	Ausencia / g

**PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE *LACTOBACILLUS PENTOSUS* LPG1**

▪ **Ensayos de Seguridad. Actividad hemolítica**

*Ferrari y col. (2016).*



Estudio de la actividad hemolítica de *L. pentosus* LPG1 en agar base suplementado con 6% de sangre de caballo desfibrinada. La cepa no mostró actividad hemolítica, lo cual es una característica valorada positivamente para su uso como agente probiótico.

▪ **Ensayos de Seguridad. Resistencia a antibióticos.**

*Sharma y col. (2015)*

CEPAS/ANTB	LPG1	LCs	LGG
E15	32	32	30
TE	21	21	20
CN10	16	17	12
P10	27	32	28
NA30	0	0	0
AMP10	37	37	25
S10	7	6	6
VA30	0	0	0
C30	29	29	33
CD2	39	39	40
K30	7	7	7
FOX30	7	8	8

Susceptible >20  
Intermedio 15–19  
Resistente ≤14

Diámetro de inhibición (mm) producido por los diferentes antibióticos probados frente a las cepas de bacterias lácticas, mediante el método de difusión en agar. Los resultados se compararon con standards del *Clinical and Laboratory Standards Institute (2012)*. Es una característica deseable que los microorganismos probióticos no muestren un perfil de resistencia a antibióticos alta, como es el caso de la cepa LPG1, comparada con los microorganismos probióticos control *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* GG.

- **Ensayos *in vitro*. Presencia de genes BSH en el genoma de *L. pentosus* LPG1.**  
*Maldonado-Barragan y col. (2011)*

Cepa	BSH1	BSH2
LPG1	-	-

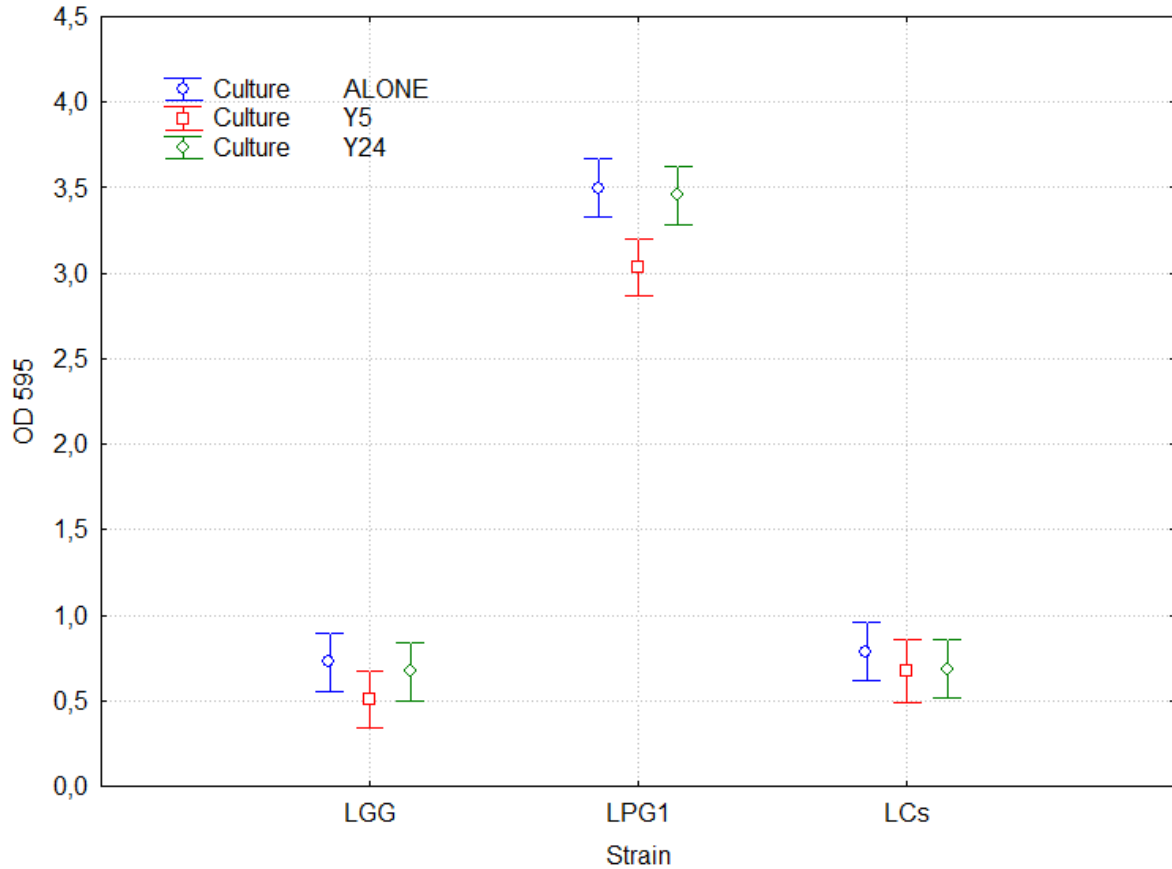
Determinación de la presencia (+) o ausencia (-) de genes BSH en la cepa LPG1 mediante la amplificación con cebadores específicos. La presencia de genes BSH están relacionados con una mayor resistencia a las sales biliares.

- **Ensayos *in vitro*. Actividad hipocolesterolemiantes**  
*Kourelis y col. (2010). Benítez-Cabello y col. (2019)*

Cepa	Reducción de colesterol (%)
LPG1	25,31 (1,34)
LC	32,31 (1,41)
LrGG	32,80 (2,36)

Porcentaje de reducción de colesterol de las cepas estudiadas en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) suplementado con Oxgall y colesterol. Los valores se expresan como media y desviación estándar (entre paréntesis). El descenso de los niveles de colesterol en sangre disminuye el riesgo de aparición de enfermedades metabólicas y formación de placas de ateroma.

- **Ensayos *in vitro*. Capacidad de auto y coagregación de *L. pentosus* LPG1 con células eucariotas.**  
*Leon-Romero y col. (2016)*

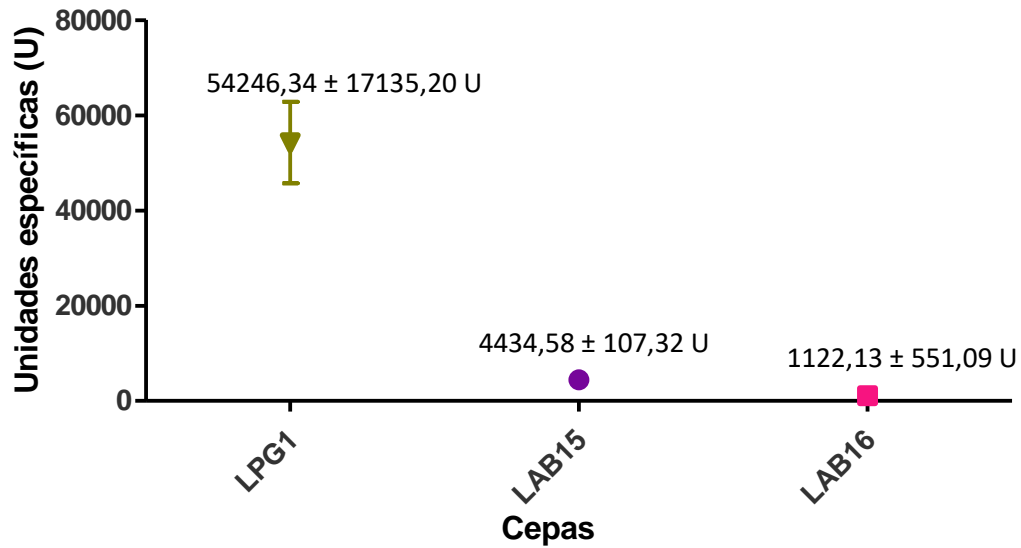


Formación de biofilms *in vitro* en monocultivo de *L. pentosus* LPG1 (azul) y cocultivo de ésta con las cepas de levaduras Y5 (rojo) e Y24 (verde), pertenecientes a las especies *Candida boidinii* y *Debariomyces etchellsii* respectivamente. Determinación mediante medición (medida a  $DO_{595}$ ) del cristal violeta extraído de biofilms teñidos con dicho compuesto. La formación de biofilms de LPG1 con las levaduras ( $DO\ 3,03\pm 0,44$  coagregación con Y5;  $DO\ 3,45\pm 0,08$  coagregación con Y24) es mucho mayor comparado con las cepas probióticas utilizadas como control. La capacidad de agregación favorece una mayor interacción con las levaduras además de la protección del microorganismo en condiciones adversas, aumentando su viabilidad.

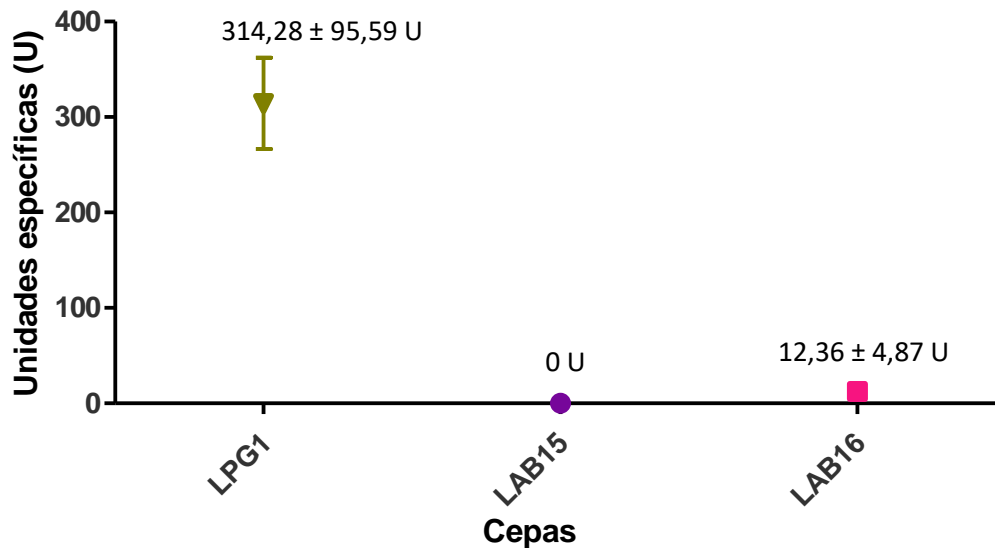
- **Ensayos *in vitro*. Actividad enzimática.**

*Bonatsou y col. (2015). Benítez Cabello y col. (2019)*

### Fitasa



### β-Galactosidasa



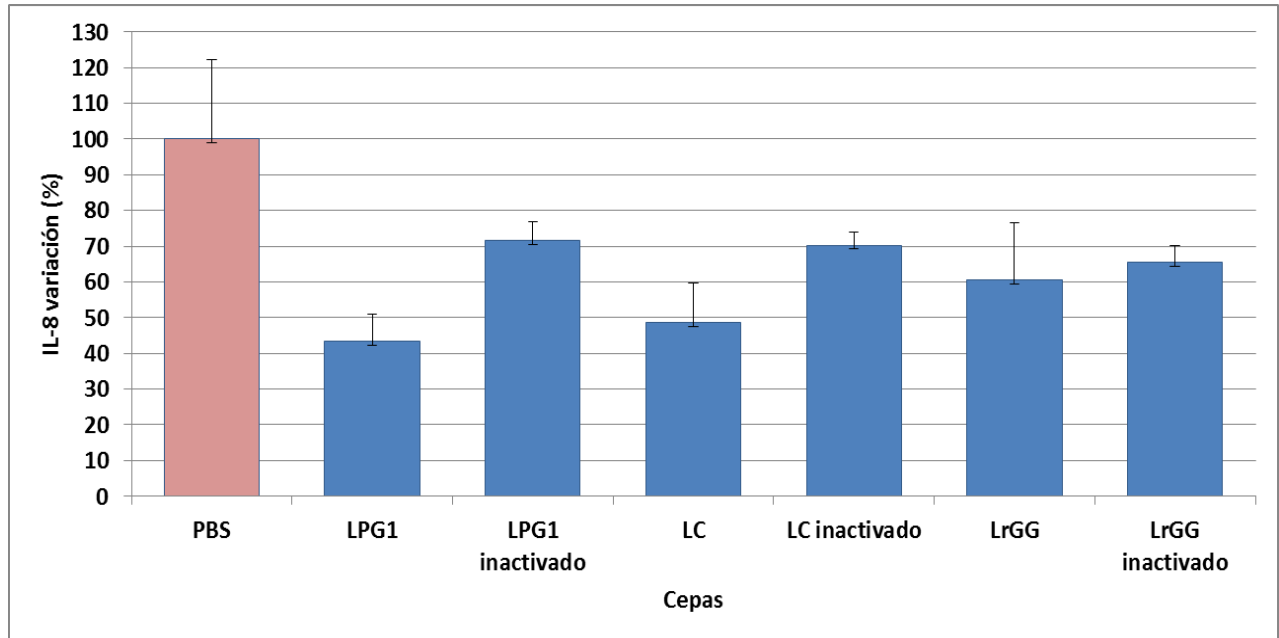
Medida *in vitro* de la actividad fitasa y β-galactosidasa de LPG1 comparados con los obtenidos para las cepas LAB15 y LAB16, pertenecientes a la especie *Lactobacillus plantarum*. Los valores son expresados como unidades específicas (UE). La fitasa es una [enzima](#) capaz de liberar [fosfato](#) y residuos minerales a partir de fitatos, componente formado en el proceso de maduración de las semillas de las plantas. Es una enzima esencial para el [proceso digestivo](#) y fundamental para la salud [ósea](#). B-Galactosidasa, en humanos, cliva la lactosa en el tubo digestivo para poder ser absorbida como galactosa y glucosa.



▪ **Ensayos *in vitro*. Actividad inmunomoduladora.**

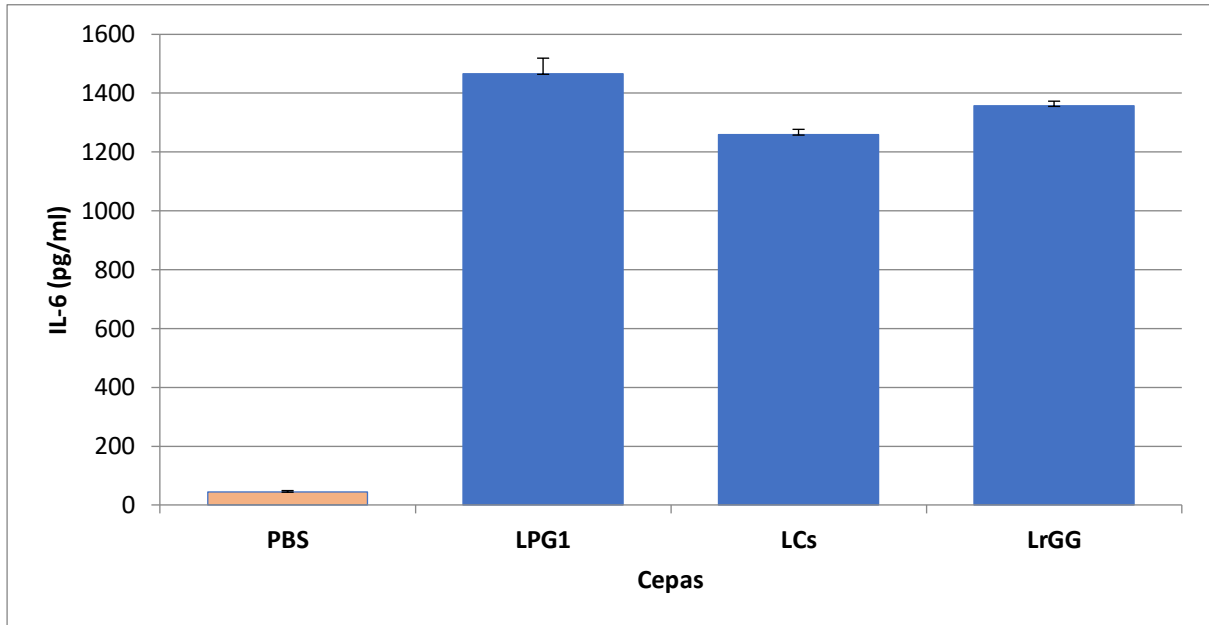
*Torres-Maravilla y col. (2015). Benítez-Cabello y col. (2020)*

• **Actividad antiinflamatoria (Reducción de Interleucina-8)**

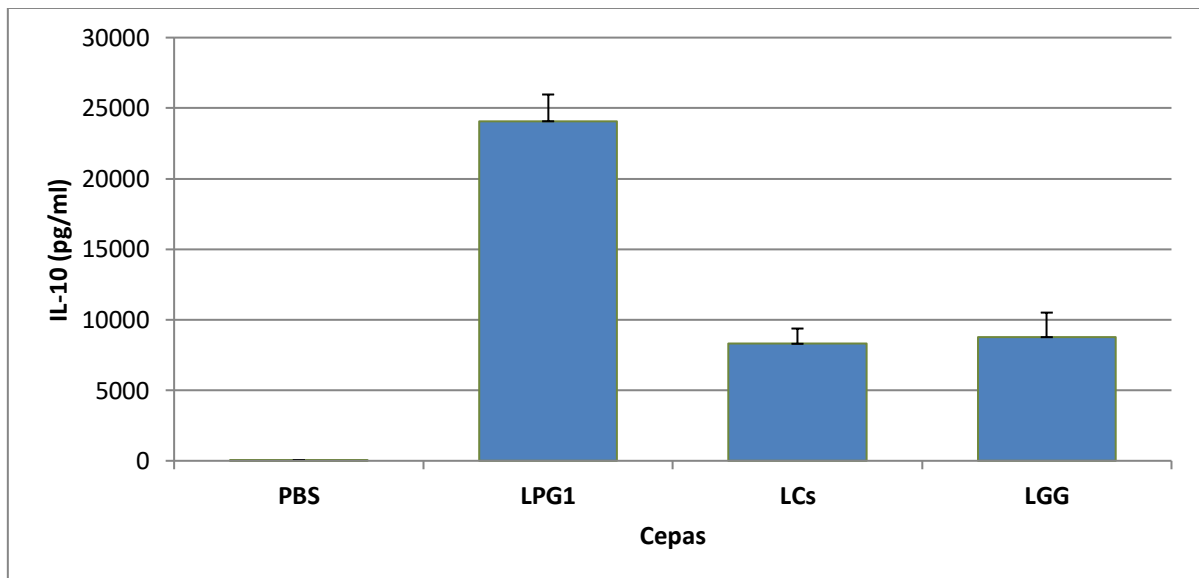


Efecto de la cepa LPG1 viva e inactivada por radiación ultravioleta, en la producción de IL-8 por la línea celular de adenocarcinoma humana HT-29 tras ser estimulada con TNF- $\alpha$ . La producción de citoquina después de la co-incubación de la bacteria y HT-29 durante 6 h se analizó por ELISA. Los resultados se expresan como porcentaje de inducción HT29/TNF. Resultados comparados con un control (PBS) y las bacterias *L. rhamnosus GG* y *L. casei Shirota* utilizados como agentes probióticos control. En todos los casos, la actividad de IL-8 se reduce respecto al control PBS. La respuesta inflamatoria se modula mediante la producción de citoquinas, siendo beneficiosa cuando éstas se producen en cantidad adecuada pero fatal si no hay una regulación de esa producción por parte de citoquinas antiinflamatorias. Mientras que IL-6 e IL-8 son las principales citoquinas en la respuesta inespecífica o inflamación. Por otro lado, IL-10 actúa como inhibidor de IL-6 e IL-8 en procesos inflamatorios.

- Ensayos *in vitro*.  
Inmunomodulación de IL-6



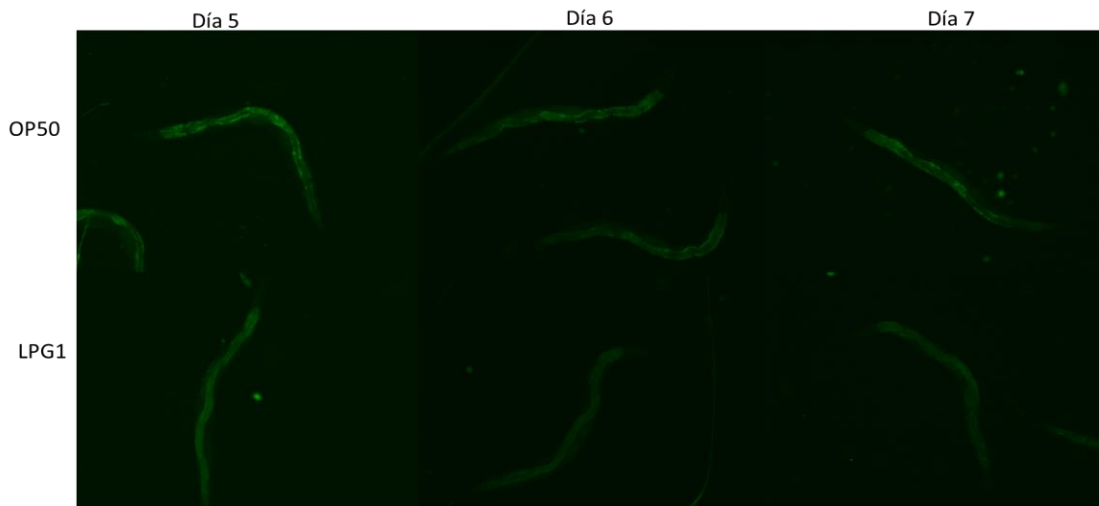
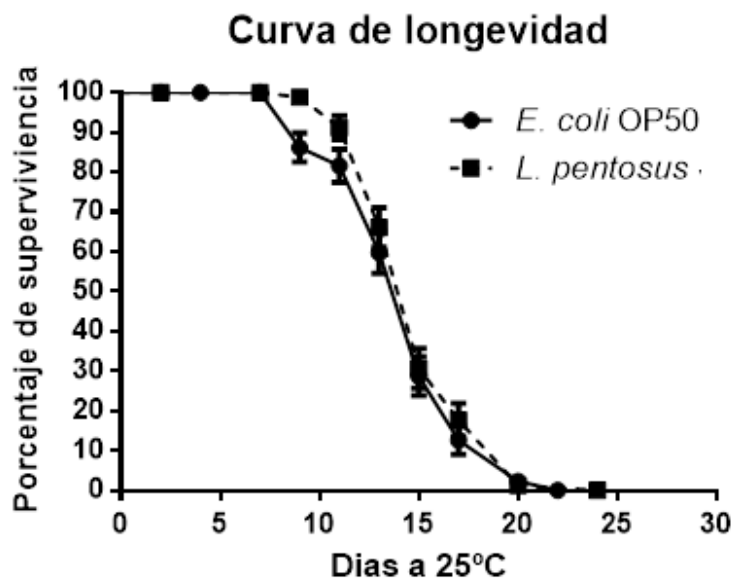
- Inmunomodulación de IL-10



Efecto de LPG1 en la modulación de la producción la citoquina proinflamatoria IL-6 y antiinflamatoria IL-10 por la línea celular macrofágica murina RAW 264.7. La producción de citoquinas después de la coincubación de la bacteria y la línea celular se analizó por ELISA. Resultados comparados con un control (PBS) y las bacterias *L. rhamnosus* y *L. casei* utilizados como agentes probióticos control. LPG1 mostró una mejor capacidad inmunomoduladora que las cepas probióticas, induciendo por un lado la producción de IL-6 y por otro,

regulando a la vez su actividad mediante la producción de IL-10 y la disminución de una reacción inflamatoria excesiva, controlando la liberación de IL-8.

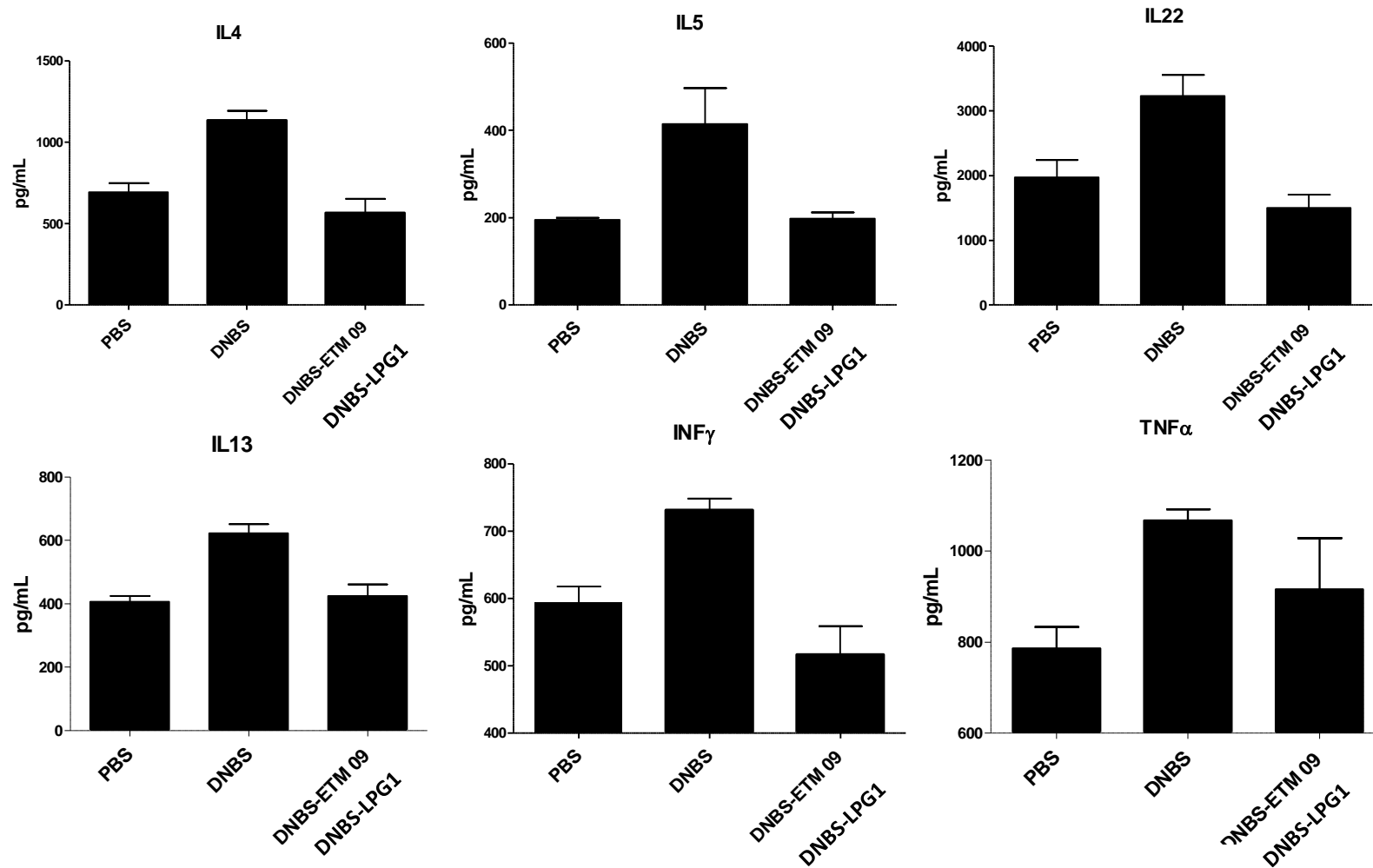
▪ Ensayos *in vivo*. Antienvejecimiento en *Caenorhabditis elegans*



Efecto de LPG1 sobre la entrada en senescencia de la población de *C. elegans*. Nótese como cuando el nematodo se alimenta con LPG1 en vez de con su alimento natural que es *E. coli*, la entrada en senescencia de la población se retrasa. Este retraso en senescencia de la población, medida como una mayor vitalidad de los

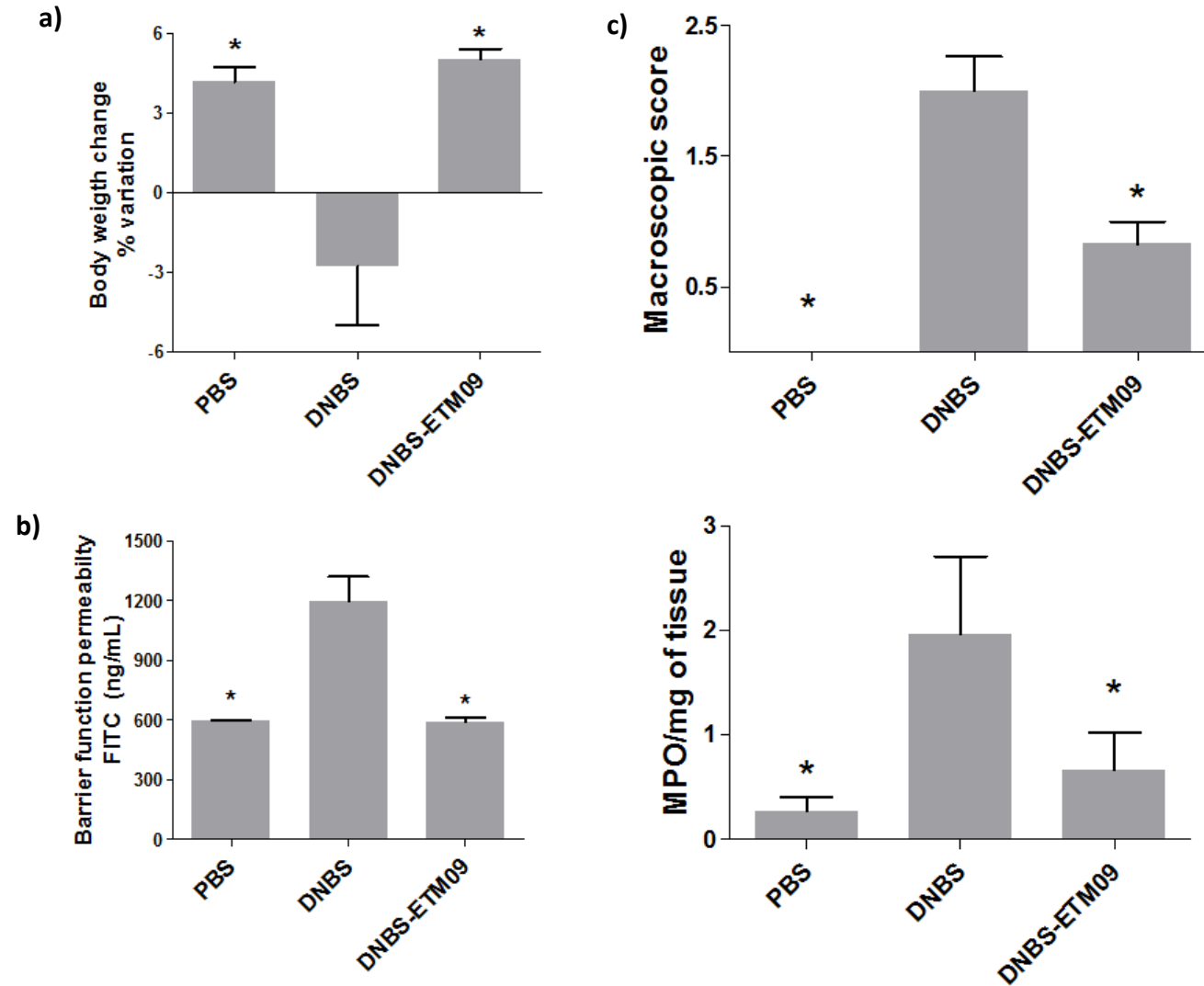
gusanos, es debido a una menor acumulación de compuestos relacionados con el envejecimiento, como es la lipofuscina.

▪ Ensayos *in vivo*. Modelo Murino. Colon cytokine concentrations in DNBS colitis model



Concentración de citoquinas (pg/mL) en esplenocitos de modelo murino con colitis inducida mediante DNBS. Comparación de grupo control de individuos sanos (PBS), con ratones con colitis inducida por ácido 2,4-dinitrobenzenosulfónico (DNBS) e individuos con colitis inducida a los que se le suministró de manera oral la cepa LPG1. (DNBS-LPG1). La adición de LPG1 modula los niveles de expresión de las citoquinas equilibrándose y siendo comparables éstos a los obtenidos en el grupo control de individuos sanos. LPG1 mostró un importante efecto inhibitor de IL-22, una citoquina que promueve la expresión génica proinflamatoria en pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias

- **Ensayos *in vivo*. Efectos de *Lactobacillus pentosus* LPG1 en un modelo murino con colitis inducida por DNBS**



Efecto de *L. pentosus* LPG1 en modelo murino con colitis inducida por DNBS. Variación del peso del ratón (%) y permeabilidad intestinal. Las puntuaciones macroscópicas (c) incluyen daños macroscópicos en la mucosa, como úlceras, engrosamiento de la pared del colon, la presencia de adherencias entre el colon y otros órganos intra-abdominales, consistencia del material fecal (como indicador de diarrea), y la presencia de hiperemia. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. El asterisco indica diferencias significativas comparadas con el grupo control (DNBS). ( $P < 0,05$ ). La adición de LP1 evita la pérdida de peso y los daños de los tejidos.

## REFERENCIAS METODOLÓGICAS

Benítez-Cabello, A., Calero-Delgado, B., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F.N. 2019. Biodiversity and multifunctional features of lactic acid bacteria isolated from table olive biofilms. *Frontiers Microbiology* 10, Art 836.

Benítez-Cabello, A., Torres-Maravilla, E., Bermudez, L., Langella, P., Martín, R., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F.N. 2020. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from table olive biofilms. *Probiotic and antimicrobial proteins* 12, 1071-1082.

Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E. Z., & Arroyo-López, F. N. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food microbiology*, 46, 66-73.

Da Silva Ferrari, I., de Souza, J. V., Ramos, C. L., da Costa, M. M., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. *Food microbiology*, 60, 29-38.

Kourelis, A., Kotzamanidis, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Scouras, Z. G., Tzanetakis, N., & Yiangou, M. (2010). Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. *J. Biol. Res.(Thessalon.)*, 13, 93-104.

León-Romero, Á., Domínguez-Manzano, J., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F. N., & Jiménez-Díaz, R. (2016). Formation of in vitro mixed-species biofilms by *Lactobacillus pentosus* and yeasts isolated from Spanish-style green table olive fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 689-695.

Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padrós, H., & Ruiz-Barba, J. L. (2011). Genome sequence of *Lactobacillus pentosus* IG1, a strain isolated from Spanish-style green olive fermentations. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5605-5605.

Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., ... & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(1), 385-396.