

producen tras la exposición de las bacterias a niveles subletales del factor de estrés y que se revierten cuando éste desaparece. La **adaptación**, en cambio, implica la adquisición permanente de un fenotipo estable de resistencia frente al factor de estrés, incluso si la bacteria es transferida numerosas veces en ausencia de éste.

II.10 Aplicación de proteómica al estudio de la respuesta a estrés

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas de una célula, organismo o sistema biológico (Görg y col., 1998) y agrupa un conjunto de técnicas con las que a partir de una muestra compleja de proteínas pueden llegar a identificarse hasta miles de ellas. Una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis bidimensional en gradientes de pH inmovilizados acoplada a identificación de proteínas por espectrometría de masas, aunque cada vez más comienzan a aplicarse otras técnicas basadas en cromatografía líquida, sobre todo en el caso de proteínas de membrana, difícilmente separables en función de su punto isoeléctrico. La electroforesis bidimensional comprende dos técnicas: el isoelectroenfoque o primera dimensión y la segunda dimensión que tiene lugar mediante una corrida electroforética tipo SDS-PAGE. Esto permite primero la separación “lineal” de mezclas proteicas complejas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) y luego la separación según su masa molecular, pero también en función de su solubilidad y de su abundancia relativa. La electroforesis 2D es la técnica de estudio más utilizada para caracterizar diferencias en la producción de proteínas como respuesta a variaciones ambientales o a factores de estrés.

A continuación (Fig. 11) se describen las 4 etapas principales de los procesos de separación e identificación de proteínas mediante electroforesis bidimensional acoplado a espectrometría de masas.

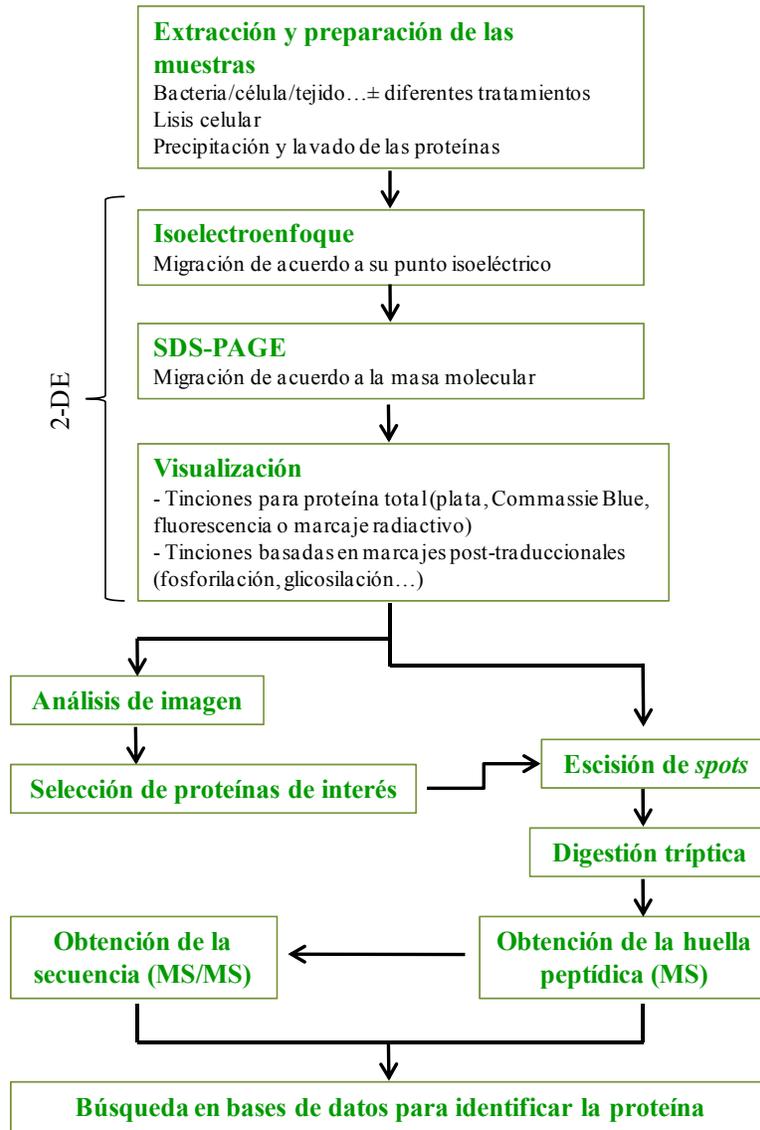


Figura 11. Diagrama de flujo que representa el proceso de identificación de proteínas mediante 2-DE acoplada a espectrometría de masas (Walker, 2005).

II.10.1 Etapa 1: Extracción y preparación de las muestras

El primer paso de cualquier técnica proteómica es la extracción de proteínas citoplasmáticas, para lo que puede utilizarse toda una variedad de métodos de lisis, tanto químicos (lisis osmótica, uso de detergentes, empleo de enzimas) como mecánicos (sonicación, bolas de vidrio o altas presiones). Una vez extraídas, las proteínas deben

ser desnaturalizadas, disgregadas, reducidas y solubilizadas para asegurar la ausencia de interacciones moleculares y asegurar así una correcta separación en función de su punto isoeléctrico. Para conseguirlo es común realizar una precipitación y lavado de las proteínas previa al isoelectroenfoque a fin de eliminar aquellos agentes que puedan provocar una migración incorrecta, como son las sales, los polisacáridos con carga y los lípidos.

II.10.2 Etapa 2: Primera dimensión: isoelectroenfoque

Esta etapa se realiza en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de pH inmovilizado que puede ser lineal o no lineal, usualmente entre 2,5 y 12. Estos geles pueden tener también una longitud variable (entre 7 y 24 cm) y debido a su pequeño ancho pueden denominarse tiras (*strips*). La inmovilización de los gradientes se logra mediante el uso de 10 derivados de la acrilamida que comparten la estructura general $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$ donde R puede ser un grupo carboxilo o un grupo amino. Con ellos pueden fabricarse tampones con pKas que varían entre 1 y 13 con la ventaja de que pueden ser copolimerizados con la matriz de poliacrilamida utilizada para crear los geles. La resolución de los geles elaborados de esta manera es muy alta, alrededor de 0,001 unidades de pH.

Los geles de primera dimensión se adquieren en el comercio de manera deshidratada, por lo que el primer paso comprende la rehidratación del gel mediante la aplicación de un voltaje bajo durante varias horas inmersos en un buffer. Tras ello se lleva a cabo el isoelectroenfoque propiamente dicho, que consiste en la aplicación de gradientes crecientes de voltaje (hasta 10.000 V) durante los cuales las proteínas migran a lo largo del gel, quedando inmovilizadas o focalizando en aquel punto donde el pH del gel y el pI de la proteína coinciden (Fig. 12).

II.10.3 Etapa 3: Segunda dimensión: electroforesis SDS-PAGE

Una vez realizado el isoelectroenfoque las tiras o *strips* se colocan sobre geles de poliacrilamida, tras lo que se lleva a cabo una corrida electroforética SDS-PAGE tradicional, en la que las proteínas se separan de acuerdo a su masa molecular (Fig. 13). Una vez finalizada, las proteínas se tiñen y visualizan, lo que da lugar a una especie de “mapa” en donde cada mancha o *spot* representa, idealmente, una sola proteína. Existen

varios métodos de tinción tanto de proteína total (plata, Coomassie Blue, marcaje con aminoácidos radiactivos o marcaje con sondas fluorescentes) como de modificaciones post-traduccionales específicas como los grupos fosfato o los residuos glicosídicos.

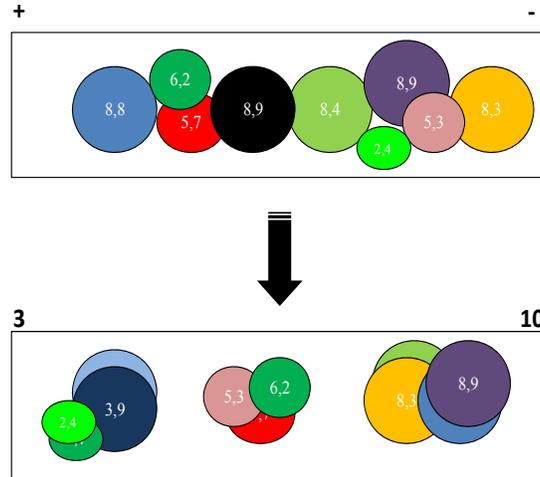


Figura 12. Representación esquemática del isoelectroenfoque o primera dimensión. Cada proteína migra en el campo eléctrico aplicado sobre el gel y queda inmobilizada en aquella zona del gel donde el pH coincide con su punto isoeléctrico.

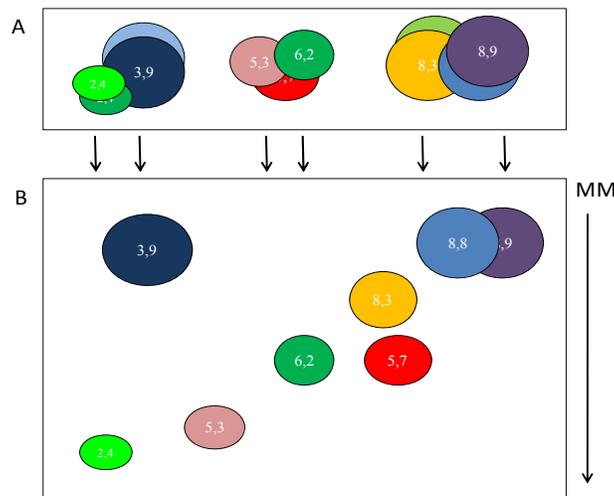


Figura 13. Representación esquemática la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes o segunda dimensión. Los geles de primera dimensión (A) se equilibran y se cargan sobre geles de poliacrilamida de ancho adecuado (B). A continuación se realiza una SDS-PAGE clásica en la que el gel de primera dimensión actúa a modo de gel de compactamiento.

Uno de los colorantes más utilizados es el Coomassie Blue debido a su simplicidad técnica y a que su respuesta estequiométrica, de acuerdo a la cantidad de proteína, es lineal en un rango mayor que otras tinciones, lo que lo hace apropiado para la comparación por densitometría de la cantidad de proteínas producidas bajo distintas condiciones. El único inconveniente es su baja sensibilidad (100 ng) en comparación, por ejemplo, a la tinción con plata (< 1 ng).

II.10.4 Etapa 4: Identificación de las proteínas mediante huella peptídica

El esquema de los pasos a seguir para la identificación de las proteínas separadas en la electroforesis se muestra en la Figura 14. Tras el análisis de las densidades de los *spots* en las condiciones experimentales estudiadas con un software especializado, éstos son escindidos de los geles y digeridos con proteasas (usualmente tripsina) para su identificación. Los péptidos resultantes son adsorbidos sobre una matriz orgánica y son ionizados mediante la tecnología de generación de iones MALDI, consistente en bombardear con láser a dichos péptidos. Cada péptido da lugar a un ión que es acelerado en un campo eléctrico para, a continuación, penetrar en un tubo de recorrido o vuelo libre sin campo eléctrico alguno. Para un voltaje de aceleración fijado, el tiempo de vuelo (time of flight: TOF) que le lleva a un ión alcanzar el detector de masas (MS) es proporcional a su relación masa/carga (m/z), por lo que a cada ión le corresponde un valor numérico. El conjunto de los valores m/z de todos los péptidos resultantes de la digestión triptica de una proteína constituye su huella peptídica. La estrategia más utilizada para identificar una proteína de acuerdo a su huella peptídica es volcar en una base de datos las relaciones de m/z obtenidas de las digestiones teóricas tras realizar una simulación MALDI/TOF/MS *in silico* con programas informáticos específicos. Posteriormente, las masas experimentales se ajustan con las teóricas usando diferentes algoritmos, lo que proporciona una identificación muy confiable de la proteína proveniente del *spot*.

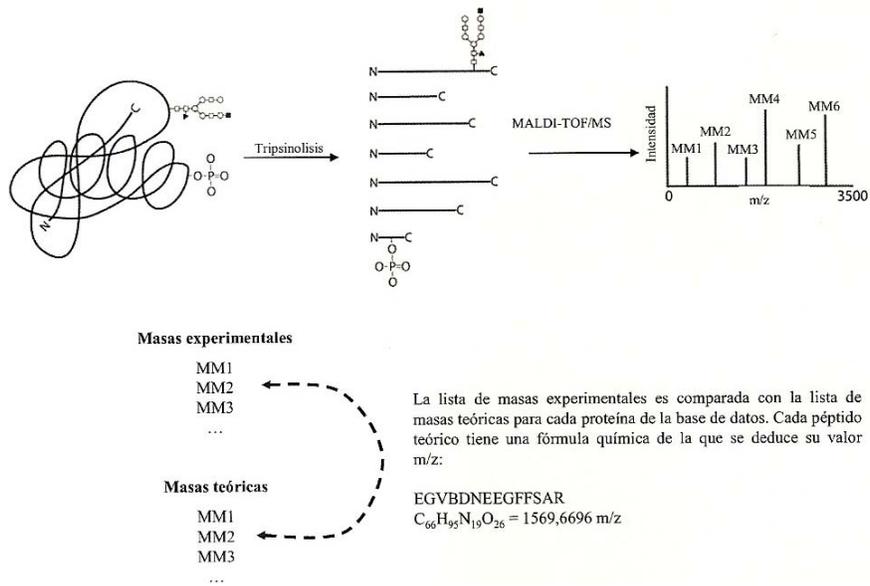


Figura 14. Representación esquemática de la identificación de proteínas mediante huella peptídica. El conjunto de masas experimentales se ajusta con las masas teóricas obtenidas para cada proteína.

CAPÍTULO IIa

**Adaptación de lactobacilos no intestinales a concentraciones fisiológicas de bilis y
caracterización preliminar**

II.a.1 Introducción

La definición de bacterias probióticas adoptada por la FAO/WHO (FAO/WHO, 2002) establece que son “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas otorgan un beneficio a la salud del consumidor”. Uno de los criterios de selección de cepas probióticas es la resistencia a la acidez gástrica y a sales biliares (FAO/WHO, 2002). Haller y col. (2001) han demostrado que ciertas propiedades metabólicas y funcionales presentes en lactobacilos intestinales se encuentran también en otras bacterias provenientes de alimentos fermentados. Además, se han descrito propiedades inmunoestimuladoras similares en cepas indígenas y exógenas en relación al modelo animal en el que se evaluaron (Vinderola y col., 2004; Dogi y Perdígón, 2006). El criterio de viabilidad celular durante el tránsito a través del TGI es, sin embargo, un requerimiento demostrado para obtener una mayor magnitud de los efectos funcionales (Ouweland y Salminen, 1998; Gill y Rutherford 2001; Maldonado-Galdeano y Perdígón 2004; Vinderola y col., 2005).

Algunas cepas de *Lactobacillus* se encuentran naturalmente presentes en el intestino humano y por esta razón son preferentemente utilizadas para uso comercial como probióticos (Vizoso Pinto y col., 2006). Cepas seleccionadas de las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum* son las especies más utilizadas por la industria láctea como probióticos (Lee y col., 1999). Por otro lado, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, dos especies muy relacionadas filogenéticamente (Miteva y col., 2001), son microorganismos importantes para las fermentaciones lácteas. En particular, son microorganismos esenciales para la industria en la producción de yogur y de quesos duros (Giraffa y col., 1998). Sin embargo, estas dos subespecies no forman parte de la microbiota del intestino humano (Tannock, 2003; Wall y col., 2006) y tienen poca capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas presentes en el TGI (Vinderola y Reinheimer, 2003). A pesar de su origen no intestinal, la administración oral de ciertas cepas de estas especies (Perdígón y col., 2000; Vinderola y col., 2007) o de productos fermentados con las mismas puede ejercer efectos benéficos en el consumidor (Adolfsson y col., 2004; Guarner y col., 2005). Otros autores (Hopkins y Macfarlane, 2002) informaron la presencia de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *lactis* en heces de individuos adultos

sanos, sugiriendo que estos microorganismos podrían provenir de la dieta y no ser parte de la microbiota establecida.

Margolles y col. (2003) demostraron la adaptación de cepas de bifidobacterias a altas concentraciones de sales biliares. La adquisición de resistencia produjo cambios fisiológicos en los patrones de fermentación de azúcares (Ruas-Madiedo y col., 2005), en actividades glucosídicas y de la enzima fructosa 6-fostato fosfocetolasa (Noriega y col., 2004; Sánchez y col., 2004), en la tolerancia a bajos pH (Noriega y col., 2004), en la capacidad de adhesión al mucus intestinal humano (Gueimonde y col., 2005) y, por lo tanto, en la capacidad de exclusión de microorganismos patógenos del ambiente intestinal (Gueimonde y col., 2007).

No existe información previa sobre los efectos de la adaptación de lactobacilos no intestinales a concentraciones fisiológicas de sales biliares.

II.a.2 Objetivo

Obtener y caracterizar derivados con resistencia incrementada a sales biliares a partir de cepas de lactobacilos de origen no intestinal y comúnmente utilizados en la industria láctea.

II.a.3 Materiales y Métodos

II.a.3.1 Cepas, medios de cultivos y condiciones de incubación

Las cepas utilizadas fueron *Lb. acidophilus* A9, 08, DRU, *Lb. paracasei* A13, *Lb. casei* DAN, *Lb. plantarum* 08342, 08329, ATCC 8014, DSMZ 20174, 036, 335, 89, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Hb2, Eb4, Bb1, Eb3, ATV, Db1, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1, Gb2, M, 242, 294, 200, 254, 193, 217, 203, 204, 219, 304, 195, 133, *Lactobacillus helveticus* 138, 36, 43. Se utilizaron cepas de origen intestinal de las especies *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* como control, a priori positivo, de cepas naturalmente resistentes. Para los ensayos de RAPD se utilizaron como cepas de referencia *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT, *Lb. acidophilus* CNRZ 1295 y *Lb. helveticus* CNRZ 241. Las cepas pertenecientes a la colección del INLAIN fueron aisladas de productos lácteos fermentados comerciales o de suero fermento natural. Las cepas se cultivaron en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) a 37°C. Los recuentos de células viables se realizaron en MRS agar (Biokar) y se incubaron 48 hs a 37°C en aerobiosis.

II.a.3.2 Sensibilidad de las cepas de *Lactobacillus* a sales biliares y aislamiento de derivados resistentes a bilis

La sensibilidad de las cepas a sales biliares se determinó de acuerdo a Vinderola y Reinheimer (2003). Cada cepa se inoculó inicialmente en caldo MRS (2% v/v) con 0,3%, 0,5% o 1% (p/v) de sales biliares bovinas (Sigma, St. Louis, MO, USA) (MRS + bilis). Los cultivos se incubaron durante 24 hs a 37°C, se midió la densidad óptica a 560 nm (D.O) y se comparó con la D.O de los cultivos controles en caldo MRS (sin sales biliares). Los resultados se expresaron como el porcentaje de crecimiento en presencia de sales biliares comparado con el control.

Las especies seleccionadas para obtener derivados resistentes a mayores concentraciones de sales biliares fueron *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus* y la cepa *Lb. acidophilus* DRU. Cada cepa (inóculo 1%) se cultivó y se repicó sucesivamente en caldo MRS adicionado de porcentajes crecientes de sales biliares (0,03%, 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,40%, 0,45% y 0,50% p/v).

Para comprobar la estabilidad de los derivados resistentes a bilis obtenidos, las cepas capaces de crecer en caldo MRS suplementado con 0,5% (p/v) de sales biliares se sometieron a seis cultivos sucesivos en caldo MRS sin sales biliares. Luego, los cultivos se inocularon en MRS + 0,5% (p/v) bilis para verificar (a través de medidas de D.O) la capacidad de los mismos de crecer nuevamente en esta condición. Las cepas originales se sometieron a las mismas condiciones de cultivo que los correspondientes derivados resistentes a bilis.

II.a.3.3 Extracción de ADN

El ADN total se obtuvo a partir de cultivos overnight de las cepas originales (20 ml) y de los derivados resistentes a bilis (40 ml) según Foley y col. (1998). La etapa de lisis celular se modificó para lactobacilos adicionando 30 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 2 U/ml de mutanolisina (Sigma-Aldrich). Los pellets de ADN se lavaron tres veces con etanol 70%, se secaron, se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM y se almacenaron a -20°C.

II.a.3.4 Confirmación de la identidad de los derivados resistentes a bilis

La identidad de los derivados resistentes a bilis se confirmó mediante amplificación y secuenciación de un fragmento de 348 pb del gen del 16S ARNr, utilizando dos primers universales (Y1 e Y2) basado en regiones conservadas del 16S ARNr de procariontes (Young y col., 1991). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 1 µl de ADN como templado, 2,5 U de ADN Taq polimerasa (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), 200nM dNTPs (GE Healthcare) y 400 nM de cada primer (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX, USA) en un volumen final de 25 µl. En todas las reacciones se incluyó un control negativo (sin ADN) y un control positivo (ADN) de las cepas originales correspondientes. Las amplificaciones se realizaron en un sistema de PCR GeneAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) según las siguientes condiciones: una desnaturación de 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 61°C y 30 seg a 72°C y un paso final de extensión de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa (1,5%) en buffer TBE, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron bajo luz UV (Sambrook y Russell, 2001). Los amplicones se purificaron utilizando columnas MicroSpin (GE Healthcare) y la

secuencia de nucleótidos se determinó mediante “primer extensión” en el Servicio de Secuenciación de Fagos Ruralex SRL (Buenos Aires, Argentina). Los datos de las secuencias nucleotídicas se compararon con los disponibles en las bases de datos públicas (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). La identidad de las cepas originales y de los derivados resistentes se chequeó mediante Nucleotide BLAST de la base de datos NCBI. Para identificar las cepas de *Lb. delbrueckii* a nivel de subespecie se realizó posteriormente un análisis de ARDRA-PCR (Análisis de Restricción del ADN Ribosomal Amplificado) de un fragmento de 1,5 kpb del gen del 16S ARNr (Giraffa y col., 1998), utilizando los primers reportados por Rodtong y Tannock (1993). Las condiciones de PCR utilizadas fueron similares a las descritas anteriormente con excepción del paso de extensión del primer el cual se prolongó a 90 seg debido a la longitud del fragmento de ADN a amplificar. El análisis de restricción *EcoRI* del ADN se realizó durante 1h a 37°C en 15 µl de buffer de incubación con 12U de la enzima de restricción *EcoRI* (GE Healthcare) y 10 µl del producto de PCR. Para confirmar las subespecies (*bulgaricus*, *delbrueckii*, o *lactis*) se analizaron los patrones de los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%).

II.a.3.5 Análisis RAPD

La diversidad genotípica entre los derivados resistentes a bilis y las cepas originales se analizó mediante RAPD-PCR utilizando dos primers arbitrarios simples: M13 y 1254 en reacciones independientes (Giraffa y col., 2004). Las condiciones de amplificación dependieron de cada primer. Para el primer M13, las condiciones fueron: 30 ciclos de 2 min a 94°C, 20 seg a 45°C y 2 min a 72°C. Cuando se utilizó el primer 1254, las condiciones fueron: 4 ciclos de 5 min a 94°C, 5 min a 36°C y 5 min a 72°C seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C y 2 min a 72°C. En ambos casos se realizó una desnaturalización inicial (3 min a 94°C) y un paso final (7 min a 72°C). Los reactivos y las condiciones de PCR y electroforesis fueron similares a las descritas anteriormente con excepción de la concentración de primers, la cual se incrementó hasta 800 nM. Como controles positivos se utilizaron ADNs de cepas de referencia (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT, *Lb. acidophilus* CNRZ 1295 y *Lb. helveticus* CNRZ 241).

II.a.3.6 Cinéticas de crecimiento

Se determinó la capacidad de crecimiento de las cepas originales y de sus derivados resistentes a bilis en presencia de sales biliares. Se inoculó caldo MRS+bilis (0,5% p/v) con un cultivo fresco de cada cepa (original y derivado) y se incubó a 37°C. El crecimiento celular se midió espectrofotométricamente (Espectrofotómetro, Metrolab 1700 UV-vis Metrolab, Buenos Aires, Argentina) a 560 nm cada 2 hs.

Por otro lado, luego de dos repiques sucesivos en caldo MRS e incubación durante 24 hs se determinó la capacidad de las cepas de crecer en leche. Cada microorganismo se inoculó (2%, aprox. 10^6 UFC/ml) en leche descremada estéril al 10% (Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) y se incubó en baño de agua a 37°C. El pH se monitoreó a los mismos intervalos de tiempo mencionados anteriormente.

II.a.3.7 Perfiles de fermentación de carbohidratos

La capacidad de las cepas originales y sus derivados resistentes a bilis de fermentar carbohidratos se determinó utilizando el kit API 50 CH (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.a.3.8 Hidrofobicidad

Se determinó la afinidad de las cepas originales y de sus derivados resistentes a bilis por una fase orgánica o acuosa como medida de su hidrofobicidad superficial, según Vinderola y Reinheimer (2003). Se obtuvieron pellets de cultivos overnight en fase estacionaria mediante centrifugación (8.000 g, 10 min, 5°C), se lavaron 2 veces en buffer fosfato (pH 7,4) y se resuspendieron en el mismo buffer. La suspensión celular se ajustó a una $D.O_{560\text{ nm}}$ de $1,0 \pm 0,1$ con buffer fosfato. Se pusieron en contacto 3 ml de la suspensión celular con 0,6 ml de n-hexadecano (Merck, Darmstadt, Alemania), y se agitó en vórtex durante 120 segundos a temperatura ambiente. Se incubó 1 h a 37°C para permitir la separación de las fases. La fase acuosa (inferior) se removió cuidadosamente con jeringa y aguja y se midió la $D.O_{560\text{ nm}}$ de la misma. La hidrofobicidad (%H) se calculó con la fórmula $\%H = [(D.O_i - D.O_f) / D.O_i] / 100$, donde $D.O_i$ y $D.O_f$ son las densidades ópticas antes y después de la extracción con n-hexadecano, respectivamente.

II.a.3.9 Resistencia al almacenamiento congelado

Se obtuvieron cultivos overnight de las cepas en caldo MRS (pH 6,8), se centrifugaron (8.000 g, 10 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS y se ajustaron a una concentración de 10^9 UFC/ml. Se centrifugaron 50 ml de cada cultivo (8.000 g, 10 min, 5°C) y se resuspendieron en 5 ml de leche descremada estéril (10%) adicionada de sacarosa (10%). Los cultivos se almacenaron durante un mes a -70°C. Para determinar la viabilidad celular se realizaron recuentos al comienzo (tiempo 0) y a 1, 7 y 30 días de almacenamiento.

II.a.3.10 Resistencia a condiciones ácidas e inducción de tolerancia a ácido

Se obtuvieron cultivos overnight de las cepas en caldo MRS (pH 6,8), se centrifugaron (8.000 g, 10 min, 5°C), se lavaron dos veces con buffer PBS, se resuspendieron (aprox. 10^8 UFC/ml) en jugo gástrico simulado (pepsina 0,3% p/v (Merck) - NaCl 0,5% p/v (Cicarelli) en buffer pH 3) y se mantuvieron en estas condiciones durante 1 h a 37°C. Como controles se utilizaron cultivos resuspendidos en PBS. Para determinar la viabilidad celular se realizaron recuentos al comienzo y al final del ensayo (1h). Luego del contacto de los derivados resistentes a bilis con el jugo gástrico simulado durante 1 h, los mismos se inocularon (2%) en caldo MRS (5 ml) y se incubaron a 37°C hasta el comienzo de la fase estacionaria temprana (16-24hs). Las células se centrifugaron y se resuspendieron en jugo gástrico simulado, en las mismas condiciones detalladas anteriormente durante 1 h a 37°C. Luego, los cultivos se inocularon nuevamente en caldo MRS hasta llegar a fase estacionaria temprana. Con el objetivo de inducir tolerancia a ácido, se realizaron seis exposiciones sucesivas a condiciones gástricas simuladas.

II.a.3.11 Análisis estadístico

Los resultados representan la media \pm desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de una vía del software SPSS. Las diferencias entre medias se determinaron utilizando test Duncan's Multiple Range (SPSS, 1996). Los datos se consideraron estadísticamente diferente con $p < 0,05$.

II.a.4 Resultados

II.a.4.1 Sensibilidad de lactobacilos de origen intestinal y no intestinal a sales biliares

En la Figura 15 se muestra la sensibilidad a sales biliares de las 36 cepas de lactobacilos utilizadas. Se observó una clara diferencia en la sensibilidad a sales biliares entre las cepas que comúnmente habitan el tracto intestinal de individuos sanos (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*) y las cepas utilizadas habitualmente para la elaboración de productos lácteos fermentados (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. helveticus*).

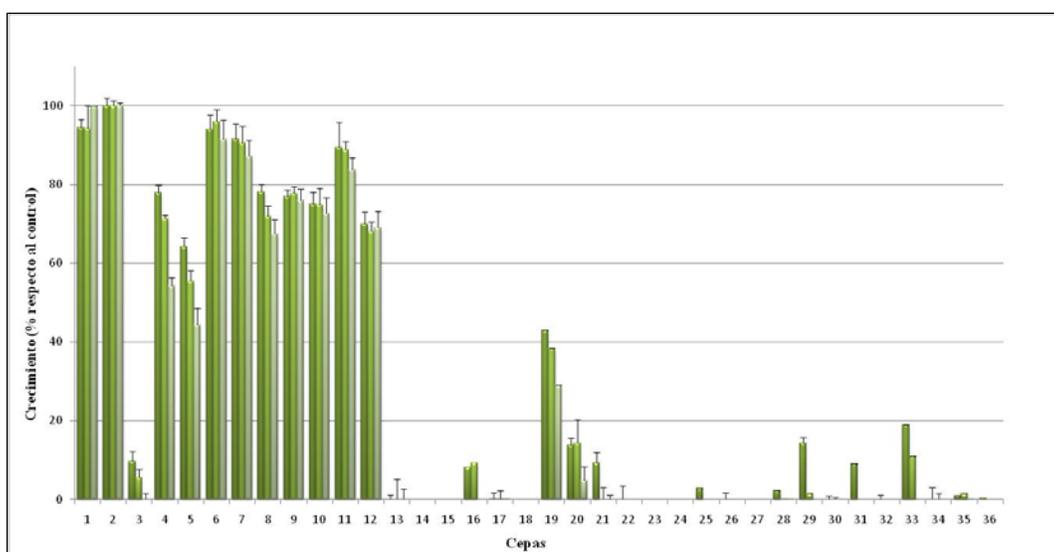


Figura 15. Sensibilidad de cepas de lactobacilos a sales biliares. El crecimiento en presencia de sales biliares [0,3 (■), 0,5(■) y 1% (■)] se expresó como porcentaje de crecimiento (D.O._{560 nm}) con respecto al cultivo control (sin sales biliares). Los ensayos se realizaron por triplicado. DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ATCC: American Type Culture Collection. *Lb. acidophilus* A9 (1), 08 (2), DRU (3), *Lb. paracasei* A13 (4), *Lb. casei* DAN (5), *Lb. plantarum* 08342 (6), 08329 (7), ATCC 8014 (8), DSMZ 20174 (9), 036 (10), 335 (11), 89 (12), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Hb2 (13), Eb4 (14), Bb1 (15), Eb3 (16), ATV (17), Db1 (18), *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* Cb1 (19), Gb2 (20), M (21), 242, (22), 294 (23), 200 (24), 254 (25), 193 (26), 217 (27), 203 (28), 204 (29), 219 (30), 304 (31), 195 (32), 133 (33), *Lb. helveticus* 138 (34), 36 (35), 43 (36).

Las primeras 12 cepas, con excepción de *Lb. acidophilus* DRU, fueron capaces de crecer en altas concentraciones (1%) de sales biliares, no así las cepas de *Lb. delbrueckii* y *Lb. helveticus*.

II.a.4.2 Obtención de derivados resistentes a sales biliares

Todas las cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* y *Lb. acidophilus* DRU fueron sometidas al proceso de adaptación a concentraciones crecientes de sales biliares. De las 25 cepas sometidas a este desafío, sólo a partir de 6 cepas (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133, 193, 200, 254, M y *Lb. acidophilus* DRU) se logró obtener derivados capaces de crecer en caldo MRS en presencia de 0,5% de sales biliares. El resto no superó, en distintas etapas, el crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de sales biliares. Luego de 6 cultivos sucesivos en caldo MRS sin sales biliares, los derivados resistentes a bilis aún mantuvieron la capacidad de crecer en MRS+bilis (datos no mostrados).

II.a.4.3 Cinéticas de crecimiento de los derivados resistentes a bilis obtenidos

La Figura 16 muestra las cinéticas de crecimiento de las 6 cepas originales y sus correspondientes derivados resistentes a bilis. Se pueden observar 3 tipos de comportamientos diferentes: (1) para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193 y 200 se observó una gran diferencia entre la densidad celular alcanzada por las cepas originales ($D.O_{560\text{nm}} < 0,3$) y sus derivados resistentes a bilis, los cuales alcanzaron densidades mayores ($D.O_{560\text{nm}} > 1,2$; Figs. 16a y b) luego de 24 hs de incubación; (2) para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* M y 254 las diferencias en D.O fueron menos marcadas ($\Delta D.O_{560\text{nm}} < 0,5$; Figs. 16c y d) y (3) para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133 y *Lb. acidophilus* DRU, las diferencias de crecimiento fueron intermedias ($\Delta D.O_{560\text{nm}}$ aprox. 0,8; Figs. 16e y f).

No se observaron diferencias significativas entre las cepas originales y los derivados resistentes a bilis en los valores de pH cuando los microorganismos crecieron en leche descremada (10%) durante 10 hs (datos no mostrados). Tampoco se observaron diferencias en la viabilidad celular luego de 30 días de almacenamiento congelado en leche descremada suplementada con sacarosa (10%).

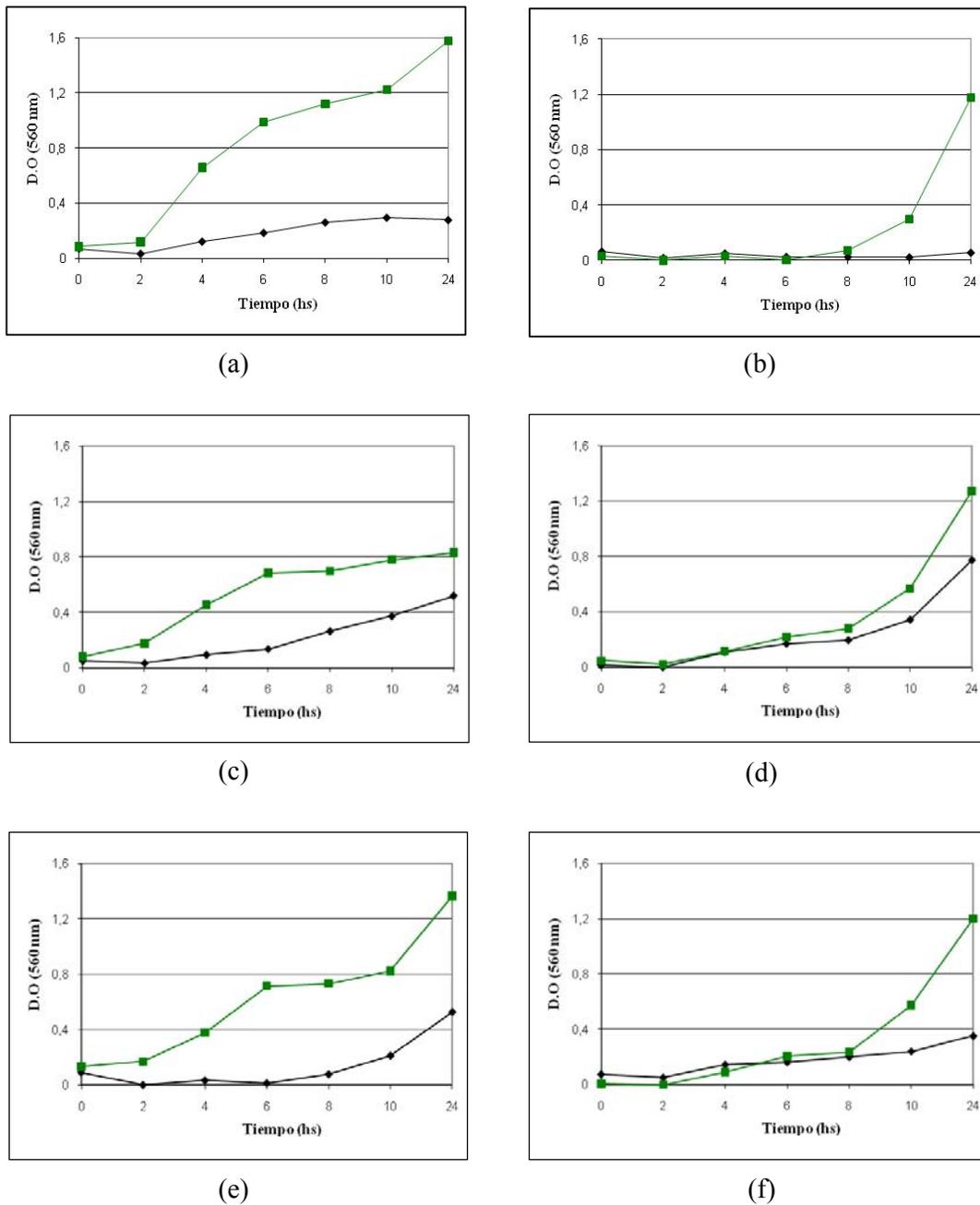


Figura 16. Cinéticas de crecimiento de las cepas originales (◆) y sus derivados resistentes a bilis (■). *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193 (a), 200 (b), M (c), 254 (d), 133 (e) y *Lb. acidophilus* DRU (f) en caldo MRS adicionado de 0,5% p/v de sales biliares. Las curvas de crecimiento son representativas de tres determinaciones independientes.

II.a.4.4 Fermentación de azúcares

Los ensayos de fermentación de azúcares se realizaron para los 50 carbohidratos del kit API 50CH. Aunque no se observaron diferencias en los patrones de fermentación luego de 48 hs de incubación entre las cepas originales y sus derivados resistentes a bilis, varios azúcares resultaron ser fermentados más lentamente por los derivados, mostrando aún falta de fermentación luego de 24 hs de incubación. Estos azúcares fueron D-galactosa y D-rafinosa para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133, D-manosa, N-acetilglucosamina, salicina, D-maltosa y D-trealosa para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193, D-galactosa, N-acetilglucosamina para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* M y D-manosa y amigdalina para *Lb. acidophilus* DRU. En la Figura 17 se muestra un ejemplo del perfil de fermentación de carbohidratos para la cepa *Lb. acidophilus* DRU y su derivado resistente a bilis.

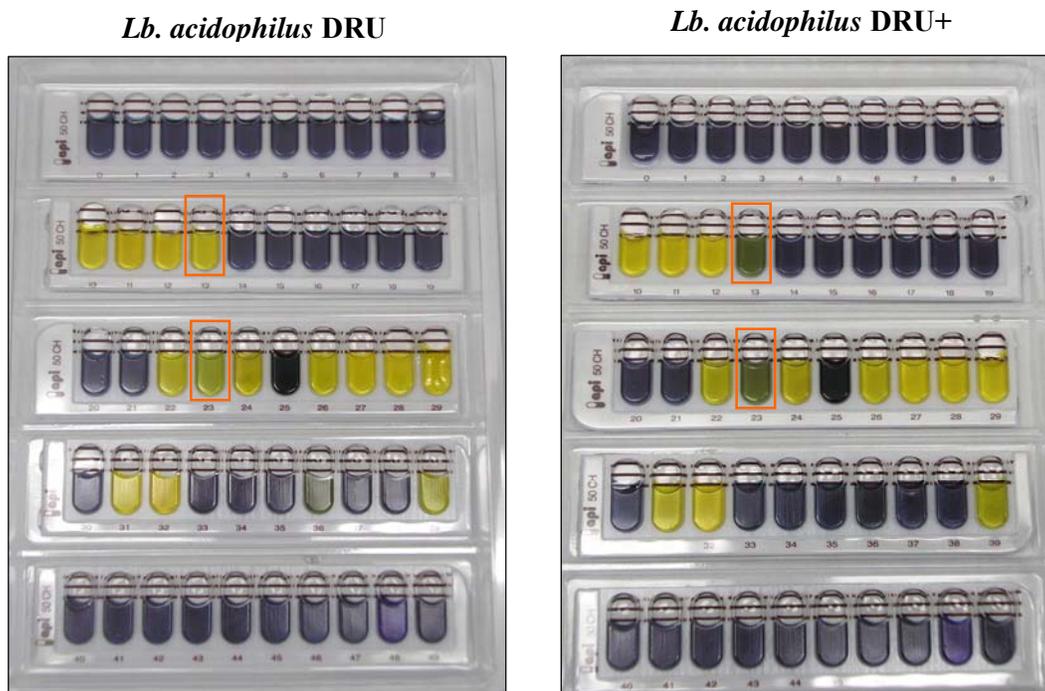


Figura 17. Perfiles de fermentación de carbohidratos de *Lb. acidophilus* DRU y su derivado resistente a bilis (*Lb. acidophilus* DRU+) luego de 24 hs de incubación. Los recuadros naranja muestran los 2 azúcares, D-manosa (13) y amigdalina (23), que fueron fermentados más lentamente por el derivado resistente a bilis.

II.a.4.5 Confirmación de la identidad de los derivados resistentes obtenidos

Los ensayos de biología molecular confirmaron que la identidad de los derivados resistentes a bilis resultó idéntica a la de sus correspondientes cepas originales. Estos resultados indicaron que las cepas resistentes a bilis eran derivadas efectivamente de sus cepas originales y no eran contaminantes que podrían haber aparecido durante el proceso de adaptación a bilis. Los análisis de diversidad genética mediante RAPD con el primer M13 mostraron que la mayoría de los fragmentos se conservaron entre cepas de una misma especie y entre original y derivado (Fig. 18). Para el caso del primer 1254, se detectó mayor variabilidad entre cepas de diverso origen pertenecientes a la misma especie. Con respecto a los pares original/derivado, la mayoría de las bandas se conservaron (Fig. 19) aunque para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193, 133 y *Lb. acidophilus* DRU se evidenciaron varias diferencias en los perfiles RAPD probablemente debidas al proceso de adaptación a bilis (Fig. 18, calles 3 y 4; Fig. 19, calles 3-4, 8-9 y 12-13).

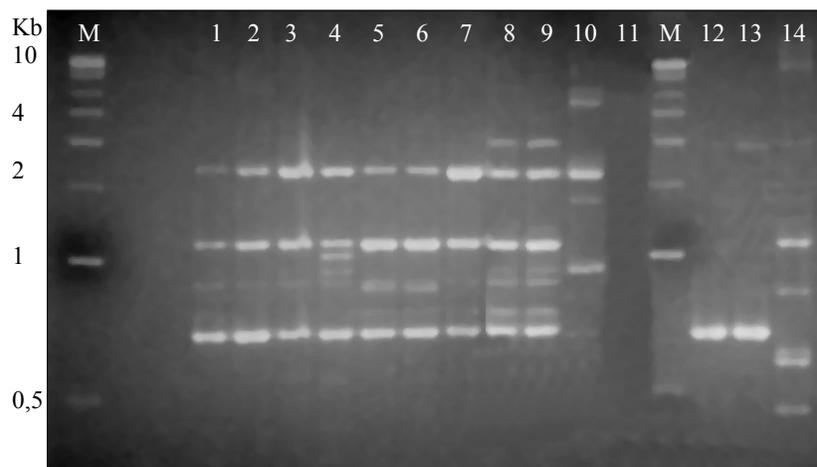


Figura 18. Perfiles RAPD de cepas de lactobacilos obtenidos con el primer M13. M: marcador de peso molecular; calle 1: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 254; calle 2: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 254+; calle 3: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193; calle 4: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193+; calle 5: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200; calle 6: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+; calle 7: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT; calle 8: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133; calle 9: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133+; calle 10: *Lb. helveticus* CNRZ 241; calle 11: control negativo PCR; calle 12: *Lb. acidophilus* DRU; calle 13: *Lb. acidophilus* DRU+; calle 14: *Lb. acidophilus* CNRZ 1295.

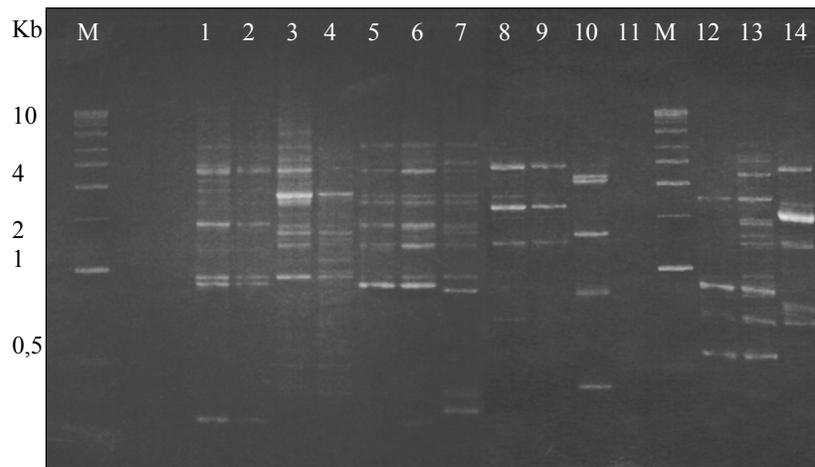


Figura 19. Perfiles RAPD de cepas de lactobacilos obtenidos con el primer 1254. M: marcador de peso molecular; calle 1: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 254; calle 2: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 254+; calle 3: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193; calle 4: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193+; calle 5: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200; calle 6: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+; calle 7: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT; calle 8: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133; calle 9: *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133+; calle 10: *Lb. helveticus* CNRZ 241; calle 11: control negativo PCR; calle 12: *Lb. acidophilus* DRU; calle 13: *Lb. acidophilus* DRU+; calle 14: *Lb. acidophilus* CNRZ 1295.

II.a.4.6 Hidrofobicidad y resistencia gástrica simulada de los derivados obtenidos

En la Figura 20 se muestran los valores de hidrofobicidad (%H) determinados para las cepas originales y sus derivados resistentes a bilis, crecidos en caldo MRS. No se encontraron diferencias significativas entre la cepa original y su derivado resistente a bilis en ninguno de los casos cuando ambos fueron desarrollados en caldo MRS.

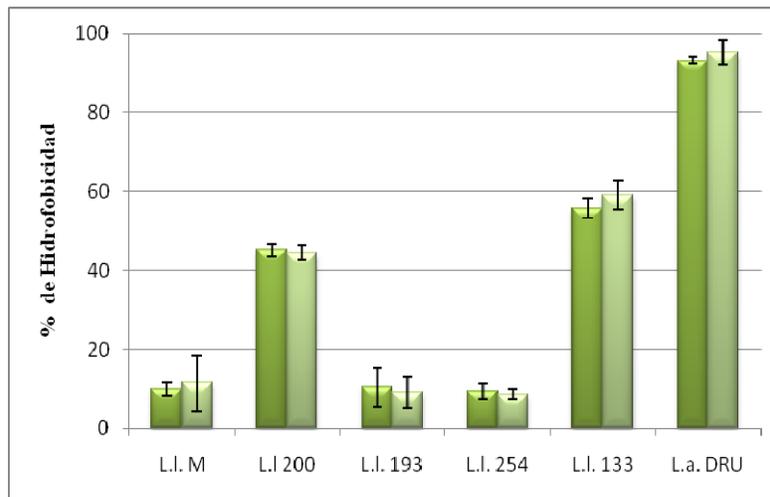


Figura 20. Porcentaje de hidrofobicidad de la cepa original (■) y su derivado resistente a bilis (■). L.I. (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*). L.a. (*Lb. acidophilus*).

Finalmente se determinó la resistencia de la cepa original y de su derivado resistente a bilis a condiciones ácidas (Fig. 21). Los cultivos frescos se resuspendieron inicialmente en una solución que simula el jugo gástrico (pH 3) y luego los derivados resistentes a bilis fueron expuestos varias veces a la misma condición de estrés ácido. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 133 y *Lb. acidophilus* DRU mostraron una elevada y natural resistencia a las condiciones ácidas y dicha característica se mantuvo luego de la inducción de resistencia a bilis. Sin embargo, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 254 mostró una elevada sensibilidad a la solución ácida (más de 2 órdenes log. de pérdida de viabilidad celular luego de 1 hora de incubación) la cual no mejoró luego de la exposición a bilis o a ácido. Para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* M, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193 y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 los valores elevados de muerte celular de la cepa original frente a valores bajos de pH (2, 4 y 2 órdenes log, respectivamente) fueron significativamente menores cuando se indujo resistencia a bilis o a ácido.

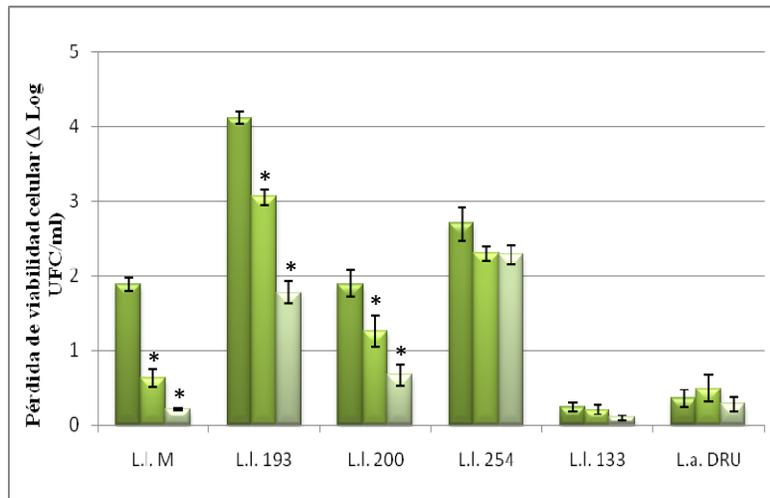


Figura 21. Sensibilidad a la acidez gástrica simulada (expresada como órdenes log de pérdida de viabilidad celular) de las cepas originales (■), derivados resistentes a bilis (■) y derivados resistentes a bilis expuestos previamente a ácidéz gástrica simulada (■). Las barras representan los valores medios \pm SD en órdenes logarítmicos de la muerte celular luego de 1 h de incubación en una solución gástrica simulada pH 3. * Diferencia estadísticamente significativa con la cepa original ($p < 0,05$). Los ensayos se realizaron por triplicado. L.l. (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*). L.a. (*Lb. acidophilus*).

II.a.5 Discusión

Los microorganismos que se ingieren con la dieta deben superar numerosos factores de estrés para sobrevivir en el tracto gastrointestinal humano. Debido a que el hígado secreta cada día aproximadamente 1 litro de bilis dentro del tracto intestinal, la exposición a la bilis representa un desafío importante. La bilis es una secreción digestiva que juega un rol importante en la emulsificación de lípidos. Tiene la capacidad de afectar a los fosfolípidos y a las proteínas de las membranas celulares y, por lo tanto, de alterar la homeostasis celular. Así, la capacidad de microorganismos patógenos y comensales de tolerar la bilis es importante para su supervivencia y posterior colonización del TGI (Begley y col., 2005), al menos de forma transitoria.

La determinación de la sensibilidad a sales biliares de las cepas de lactobacilos utilizadas en este trabajo mostró que *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. acidophilus*, con excepción de la cepa *Lb. acidophilus* DRU, son naturalmente resistentes a sales biliares en relación a *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. helveticus*. Estos resultados son similares a los publicados por Kociubinsky y col. (1999) quienes observaron que la mayoría de las cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ensayadas presentaban elevada sensibilidad a sales biliares. Numerosos estudios demuestran la gran variabilidad en la resistencia a bilis que se puede encontrar entre especies o géneros de bacterias (Begley y col., 2005). Aunque las cepas de *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. acidophilus* utilizadas en este trabajo fueron originalmente aisladas de productos lácteos fermentados comerciales o provenientes de colección, estas especies son habitantes naturales del tracto intestinal de seres humanos sanos (Tannock, 2003; Wall y col., 2006). Por esta razón, estas cepas estarían mejor adaptadas para resistir las barreras biológicas presentes en el intestino (acidez gástrica, sales biliares, lisozima, etc). Trabajos previos han demostrado que la exposición de células a niveles subletales de un determinado factor de estrés permite que las mismas se adapten y puedan, de este modo, resistir posteriores exposiciones a niveles letales de dicho factor (Bunning y col., 1990, O'Driscoll y col., 1996). En nuestro caso, de un total de 25 cepas que fueron sometidas al proceso de adaptación a mayores concentraciones de sales biliares, sólo 6 cepas fueron capaces de adaptarse y crecer en presencia de 0,5% (p/v) de sales biliares bovinas. Estos microorganismos resultan ser los primeros lactobacilos de origen no

intestinal con resistencia adquirida a sales biliares reportados en la literatura. La concentración de bilis (0,5% p/v) utilizada para el proceso de adaptación se encuentra dentro del rango fisiológico y ha sido previamente utilizada por otros investigadores para simular el ambiente del intestino delgado (Marteau y col., 1997; Mainville y col., 2005).

Se ha observado que la naturaleza hidrofóbica de la superficie externa de la célula microbiana estaría involucrada en la fijación de las bacterias a los tejidos del huésped (Rosemberg y col., 1980). Esta propiedad podría otorgar una ventaja competitiva, importante para la bacteria para mantenerse en el TGI humano (Naidu y col., 1999). Contrariamente a los resultados publicados por Gueimonde y col. (2005) para bifidobacterias, en nuestro trabajo no se observaron diferencias en la hidrofobicidad superficial de la cepa original y su derivado resistente a bilis desarrolladas en MRS en ausencia de sales biliares, indicando que, probablemente, no ocurrieron cambios significativos en la superficie celular de los derivados. Por otro lado, Waar y col. (2002) informaron que una cepa patógena de *Enterococcus faecalis* presentó mayor capacidad de adhesión cuando la misma creció en presencia de sales biliares y mayor hidrofobicidad.

Los ensayos de fermentación de azúcares realizados utilizando el kit API 50CH mostraron que varios azúcares fueron fermentados más lentamente por los derivados resistentes a bilis que por la cepa original. Esto sugiere que la adquisición de resistencia a bilis podría haber inducido cambios en la absorción o el metabolismo de ciertos azúcares. Taranto y col. (2006) encontraron una notable disminución en la absorción de glucosa cuando una cepa de *Lb. reuteri* fue expuesta a ácidos biliares y Begley y col. (2005) informaron que varias proteínas involucradas en el transporte de azúcares resultaron modificadas por exposición a sales biliares.

Por otro lado, la adquisición de tolerancia a bilis no afectó la capacidad de los derivados resistentes a bilis de crecer en leche ni la supervivencia durante el almacenamiento congelado (1 mes a -70°C en leche), un aspecto tecnológico de interés para la industria láctea.

En relación a la resistencia cruzada (resistencia a ácido por inducción de resistencia a sales biliares), Noriega y col. (2004) observaron mayor resistencia a pH bajos en varias cepas de bifidobacterias con resistencia adquirida a sales biliares. En

nuestro trabajo, algunas de las cepas con resistencia adquirida a sales biliares también mostraron mayor supervivencia cuando fueron expuestas a la acidez gástrica simulada. Además, fue posible inducir mayor supervivencia a condiciones ácidas en varios derivados resistentes a bilis mediante sucesivos pasajes en esta condición de estrés. De modo similar, un estudio realizado por Park y col. (1995) demostró que una cepa de *Bifidobacterium breve* adaptada a ácido presentó mayor supervivencia, comparada con cepas no adaptadas, no sólo en condiciones ácidas sino también en presencia de otros factores de estrés tales como bilis, peróxido de hidrógeno y almacenamiento en frío. Se conoce que varios factores de estrés producen efectos similares en la fisiología de la célula y, por lo tanto, podrían causar inducción del mismo set de proteínas de respuesta a estrés (Begley y col., 2005). Cepas resistentes a ácido seleccionadas de esta manera podrían resultar útiles para aplicaciones como probióticos y podrían presentar una sobrevivencia mejorada tanto en las condiciones del huésped como en sistemas alimenticios (Ross y col., 2005).

En esta parte del trabajo, se demostró que es posible utilizar un método natural para adaptar cepas de *Lactobacillus* a sales biliares, las cuales podrían ser utilizadas como potenciales probióticos. Se debe considerar que bacterias ácido lácticas starters tales como *Streptococcus thermophilus*, *Lb. helveticus* o *Lb. delbrueckii* están presentes en elevadas concentraciones en los productos lácteos fermentados y podrían producir metabolitos beneficiosos para la salud como exopolisacáridos y péptidos (Champagne y col., 2005) durante el tránsito intestinal si son capaces de sobrevivir a las barreras biológicas encontradas. Además, se ha visto que células viables o no de estos microorganismos pueden modular la función inmune del intestino a través de sus paredes celulares (Granette y col., 2004). La adquisición de mayor resistencia a barreras biológicas como bilis y acidez podría incrementar el potencial probiótico de especies de *Lactobacillus* utilizadas generalmente en la elaboración de productos lácteos fermentados ya que se incrementa la posibilidad de que los mismos alcancen el ecosistema intestinal en forma viable.

II.a.6 Conclusiones

El proceso de adaptación a bilis al cual fueron sometidas las cepas sensibles permitió que algunos lactobacilos de origen no intestinal fueran capaces de crecer en presencia de concentraciones fisiológicas de sales biliares. Algunos de los derivados resistentes a bilis mostraron también ser resistentes o tener la capacidad de adquirir resistencia a condiciones ácidas, mientras que no se observaron cambios en los perfiles de fermentación de azúcares, hidrofobicidad y capacidad de acidificación en leche. La adaptación a altas concentraciones de sales biliares y pH bajos podría ser una herramienta valiosa para incrementar la supervivencia en el TGI de lactobacilos de origen no intestinal de alto valor industrial utilizados para la elaboración de productos lácteos fermentados, incrementando así su potencial probiótico.

CAPÍTULO IIb

Estudio del impacto de la adaptación a sales biliares sobre las características fisiológicas de la cepa

II.b.1 Introducción

En el capítulo anterior, se describió la obtención de derivados resistentes a bilis a partir de lactobacilos no intestinales. La adquisición de resistencia permanente a bilis permitió que estas cepas tuvieran la capacidad de crecer en presencia de concentraciones fisiológicas de sales biliares. Esto resultaría una herramienta natural y valiosa para incrementar la supervivencia de lactobacilos no intestinales en el ecosistema gastrointestinal, incrementando su potencial probiótico. La respuesta a estrés por bilis ha sido estudiada mediante proteómica y genómica para *Lactobacillus plantarum* (Bron y col., 2004b; 2006), *Lactobacillus reuteri* (Lee y col., 2008a; Whitehead y col., 2008) y *Lactobacillus acidophilus* (Pfeiler y col., 2007). Para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se han realizado estudios de proteómica durante el crecimiento en caldo MRS o bajo condiciones de estrés impuestas por ácido láctico (Lim y col., 2000), calor (Gouesbet y col., 2002) o secado spray (Silva y col., 2005). Según nuestro conocimiento, este trabajo es el primer análisis proteómico de la especie *Lb. delbrueckii* bajo condiciones de estrés por bilis.

II.b.2 Objetivo

Estudiar el fenómeno de tolerancia a bilis en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200, una cepa además con marcada capacidad de autoagregación; y en su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+.

II.b.3 Materiales y Métodos

Los estudios de proteómica se realizaron en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Asturias, España, bajo la dirección de la Dra. Clara González de los Reyes Gavilán.

II.b.3.1 Cepas y condiciones de cultivo

La cepa utilizada en este capítulo y el siguiente fue *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+. Esta cepa fue la única, entre los 6 derivados resistentes a bilis, que presentó una marcada capacidad autoagregante, por lo que es de interés conocer el efecto de la adaptación a sales biliares en la capacidad autoagregante, hidrofobicidad, capacidad de adhesión e interacción con el intestino. Las cepas se cultivaron en caldo MRS a 37°C durante 18 hs. Luego de centrifugar (8.000 g, 10 min, 5°C), las células se resuspendieron en caldo MRS adicionado de glicerol 20% (v/v) y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de ser utilizadas. Como procedimiento estándar, se reactivaron las cepas a partir de los stocks congelados y se realizaron repiques (2% v/v) en caldo MRS (Difco, Detroit, Michigan, USA). El tiempo de incubación fue variable según el experimento realizado. Para el recuento de bacterias se realizaron diluciones decimales en solución Ringer's (Merck, Darmstadt, Alemania) las cuales se sembraron en medio MRS agar (Biokar) y se incubaron a 37°C durante 48hs.

II.b.3.2 Cinéticas de crecimiento en presencia de sales biliares

Se determinó la capacidad de las cepas de crecer en presencia de diferentes concentraciones de sales biliares con el objetivo de encontrar una concentración de bilis en la cual pudieran crecer tanto la cepa original (crecimiento mínimo) como el derivado resistente a bilis. Esta concentración de bilis se utilizó para obtener, posteriormente, la fracción de proteínas citoplasmáticas de ambos microorganismos para estudiar su **respuesta** a la bilis. Cultivos overnight (18hs) de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ se inocularon en caldo MRS (2% v/v) adicionado de 0%, 0,2% ó 0,5% (p/v) de bilis bovina (Sigma) y se incubaron en baño de agua a 37°C. El

crecimiento celular se midió a $D.O_{600nm}$ a diferentes intervalos de tiempo. Se realizaron dos cultivos independientes para cada condición.

II.b.3.3 Extracción de proteínas libres de células para electroforesis 2D

Lb. delbrueckii subsp. *lactis* 200 y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+, se cultivaron a 37°C en caldo MRS sin bilis (para el estudio de **adaptación**) y en caldo MRS adicionado de una concentración no completamente inhibitoria de bilis (para el estudio de **respuesta**). La concentración de sales biliares bovinas seleccionada en el estudio previo fue del 0,2% p/v. Las células se recogieron a mitad de la fase exponencial de crecimiento. Los cultivos se centrifugaron (8.000 g, 10 min, 4°C) y se lavaron 2 veces con buffer Tris-HCl 0,1M pH 7,5. Los pellets obtenidos a partir de 50 ml de cultivo se resuspendieron en 5 ml de buffer Tris-HCl 1M pH 7,5 y se lisaron utilizando un disruptor celular (Constant Systems Ltd., Daventry, Reino Unido) a $2,05 \times 10^8$ Pa de presión. Las células intactas y los restos celulares se removieron por centrifugación (8.500 g, 15 min, 4°C) y las vesículas de membranas se eliminaron por ultracentrifugación (50.000 g, 20 min, 4°C). La concentración de proteínas se midió utilizando el kit BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.b.3.4 Condiciones para la electroforesis 2D e identificación de proteínas

Las proteínas citoplasmáticas de ambas cepas se analizaron mediante electroforesis 2D como se describió previamente (Anglade y col., 2000; Marceau y col., 2004). Como primer paso se eliminaron los ácidos nucleicos presentes en 500 µg de extracto proteico mediante incubación durante 30 min a 37°C en presencia de 50U de Benzonasa (Merck KGaA) y $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 mM. Luego se precipitaron las proteínas utilizando el método metanol-cloroformo (Wessel y Flugge, 1984) y se solubilizaron en 40 µl de una mezcla de urea desionizada 6,5 M, tiourea 2,17 M (GE HealthCare, Biosciences, Uppsala, Suecia), 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS; Sigma) 65mM, dithiothreitol 100 mM (DTT) y buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,8 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). El volumen final se ajustó a 380 µl con una solución de urea desionizada 6,5 M, tiourea 2,17 M, CHAPS 65 mM, DTT 100 mM, transportador de anfolitos pH 4,0-7,0 0,5% (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA) y 2 μ g de azul de bromofenol. Esta solución se utilizó para rehidratar los geles (*strips*) o tiras (24 cm) de la primera dimensión con gradiente de pharmalyte inmovilizado pH 4,0 a 7,0 (GE HealthCare), los cuales posteriormente fueron focalizados a 60.000 Vxh en un equipo IPGphor (GE HealthCare). Las tiras se equilibraron durante 15 min en buffer [Tris-HCl 1M pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 1% (p/v)] adicionado de DTT 0,83% (p/v) y luego en iodoacetamida 7,5% (p/v) durante otros 15 min. Para la segunda dimensión (electroforesis SDS-PAGE) se utilizó un sistema Ettan Dalt Six System (GE HealthCare) (corriente constante de 10 mA/gel, 4°C) con una concentración final de poliacrilamida de 12,5% (p/v). Los geles de proteínas se tiñeron con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. La detección de los *spots* y la cuantificación se realizaron con el software ImageMaster Platinum (versión 5.00 GE HealthCare). Para cada condición se realizaron al menos 3 geles independientes a partir de 3 extracciones independientes, cada una de un replicado diferente. El efecto de la bilis sobre la producción de proteínas se determinó estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de los volúmenes normalizados de los *spots* usando como factor la concentración de bilis en 2 categorías 0% y 0,2%, y el tipo de cepa en 2 categorías, cepa original y derivado resistente a bilis ($p < 0,05$). La cuantificación de las variaciones en la intensidad de los *spots* se denominó factor de variación (FV) y se fijó a 1,8 basado en el análisis estadístico previo.

Los *spots* se escindieron de los geles 2D utilizando tips de micropipetas con la punta seccionada. Las proteínas se identificaron mediante huella peptídica posterior al tratamiento con tripsina y MALDI-TOF-MS en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIN, Madrid, España). La identificación de las proteínas se realizó utilizando los 2 genomas disponibles de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en la base NCBI. Las anotaciones se realizaron de acuerdo a los grupos funcionales COG (cluster of orthologous genes). Para identificar las vías metabólicas de algunas proteínas se utilizó la base de datos BRENDA Enzyme Database (<http://www.brenda-enzymes.info>).

II.b.3.5 Actividad metabólica de células en reposo (resting cells)

Con el objetivo de profundizar el estudio de los posibles cambios en el metabolismo de los carbohidratos debido a la adaptación a bilis en el derivado resistente

respecto a la cepa original, se determinó el consumo de glucosa y la formación de ácidos orgánicos en suspensiones tamponadas de células en reposo (Ruas-Madiedo y col., 2005). Las determinaciones se realizaron en tres replicados independientes. Se cultivó la cepa original y su derivado resistente a bilis en caldo MRS sin bilis hasta mitad de la fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600nm}$ aprox. 1,2) y las células se recogieron por centrifugación (8.000 g, 10 min, 5°C). Los pellets se lavaron 2 veces con buffer fosfato de potasio 33 mM pH 7,0 para eliminar restos de medio de cultivo. Las células se resuspendieron en buffer fosfato de potasio 33 mM pH 5,6 adicionado de glucosa 25 mM y se incubaron durante 4 hs a 37°C con agitación constante. Finalmente se eliminaron las células mediante centrifugación y se recolectaron los sobrenadantes para análisis de metabolitos por HPLC. Para el análisis cromatográfico se utilizó un inyector Alliance 2690, un detector de arreglos de fotodiodos PDA 996, un detector de índice de refracción (IR) 410 y el software Empower (Waters, Milford, MA, USA). La separación de la muestra (volumen de inyección de 50 μ l) se realizó en una columna de intercambio iónico IC9ep ION-300 (Transgenomic, San José, CA, USA) con H_2SO_4 8,5 mN como fase móvil a 65°C y con un flujo de 0,4 ml/min. La glucosa se detectó con el detector IR y los ácidos orgánicos con el detector PDA a 210 nm. Para la cuantificación se calculó la ecuación de regresión ($R^2 \geq 0,99$) utilizando diferentes concentraciones de estándares (Sigma). Los resultados se expresaron como mM y se calculó el cociente ácido láctico/ácido acético (L/A).

II.b.3.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el test ANOVA de una vía del software SPSS 11.0 de Windows (SPSS inc., Chicago IL). Para los ensayos de consumo de glucosa y formación de ácidos orgánicos en células en reposo se realizaron tests ANOVA independientes utilizando como factor la cepa en sus dos categorías: original y derivado.

II.b.4 Resultados

II.b.4.1 Cinéticas de crecimiento en presencia de concentraciones fisiológicas de sales biliares

En la Figura 22 se pueden observar las cinéticas de crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ en presencia de diferentes concentraciones de sales biliares. El crecimiento de ambas cepas resultó inhibido en presencia de 0,5% de sales biliares para las 10 hs de cultivo. El derivado resistente a bilis necesita al menos 18 hs de cultivo para desarrollar con esta concentración de sales biliares. Para realizar los estudios posteriores se eligió una concentración de bilis de 0,2% (p/v) ya que a esa concentración se observó un crecimiento moderado de la cepa original y un crecimiento normal del derivado resistente a bilis para ese tiempo de cultivo (10 hs). Las muestras para los estudios de proteómica se obtuvieron cuando los diferentes cultivos alcanzaron una D.O_{600nm} de 0,6. El tiempo requerido para alcanzar dicha D.O fue entre 2 y 10 hs dependiendo de la cepa y de la presencia o ausencia de bilis.

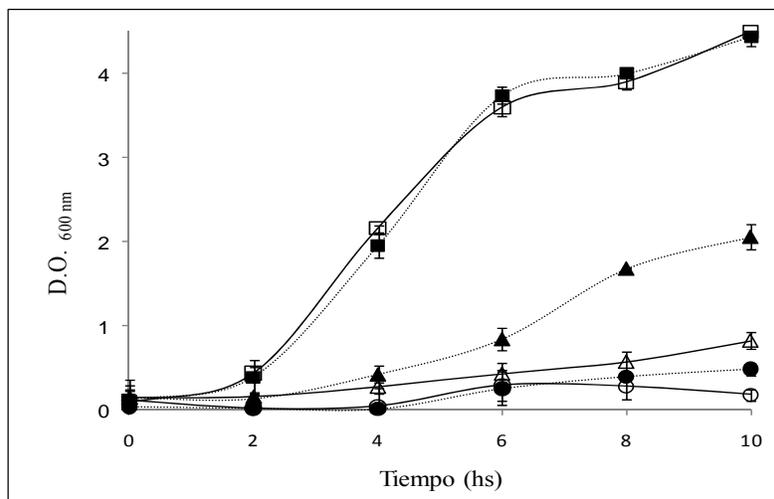


Figura 22. Cinética de crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+. Las líneas continuas con símbolos blancos representan la cepa original y las líneas punteadas con símbolos negros el derivado resistente a bilis. Crecimiento en caldo MRS con 0% (cuadrados), 0,2% (triángulos) y 0,5% (p/v) (círculos) de sales biliares bovinas.

II.b.4.2 Estudio proteómico de la adaptación a bilis de las cepas Lb. delbrueckii subsp. lactis 200 y 200+

El estudio proteómico se focalizó en las proteínas citoplasmáticas con punto isoeléctrico en el rango de pH de 4 a 7. En estas condiciones la cobertura estimada del proteoma teórico de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* fue 52,1%, extrapolado de los datos proteómicos *in silico* obtenidos de los 2 genomas de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* disponibles en la base NCBI (datos no mostrados) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>). La comparación de los proteomas de las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y 200+ en ausencia de sales biliares permitió identificar los cambios constitutivos (adaptación) que otorgaron un fenotipo resistente a bilis estable a la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+.

En la Figura 23 se observan los geles de proteínas (2D) obtenidos a partir de extractos libres de células de las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y 200+, desarrolladas en presencia y ausencia de sales biliares. Se detectaron 52 *spots* de proteínas cuyas expresiones mostraron diferencias significativas, los cuales fueron aislados del gel e identificados.

Para los análisis posteriores sólo se tuvieron en cuenta los *spots* cuyo factor de variación (FV) fue mayor a 1,8 (sobreexpresión o regulación positiva) o menor a 0,55 (subexpresión o regulación negativa). Según este criterio adoptado, la presencia de bilis modificó la expresión de 35 proteínas (Tabla 14).

Las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y 200+ presentaron 9 proteínas que fueron inducidas o inhibidas en presencia de sales biliares en ambas cepas (fenómeno denominado **respuesta**). Resultó afectada la producción de 3 enzimas de la vía glicolítica (Tabla 14; Figura 24). En ambas cepas, la fosfoglicerato mutasa (Fig. 23 *spot* 393) y la gliceraldehído 3-P dehidrogenasa (Fig. 23 *spot* 266) resultaron sobreexpresadas, mientras que la fructosa-bifosfato aldolasa resultó disminuida (Fig. 23 *spot* 410). Además de afectar la producción de enzimas del metabolismo de los carbohidratos, la exposición a bilis modificó los niveles de otras proteínas involucradas en diferentes categorías funcionales como transcripción y traslación, metabolismo de lípidos, biosíntesis de peptidoglucanos y exopolisacáridos en ambas cepas (Tabla 14, Fig. 23), como es el caso de la proteína EF-Tu (elongation factor Tu) cuya expresión resultó disminuida en presencia de sales biliares (Tabla 14, Fig. 23: *spot* 215).

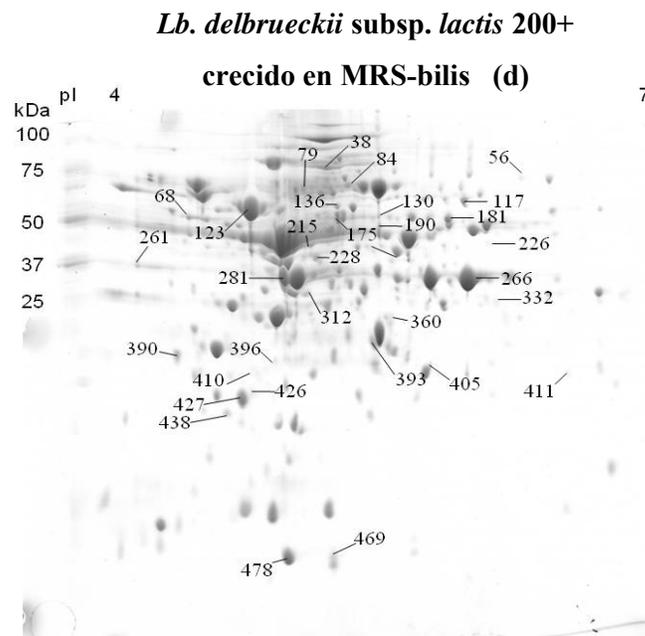
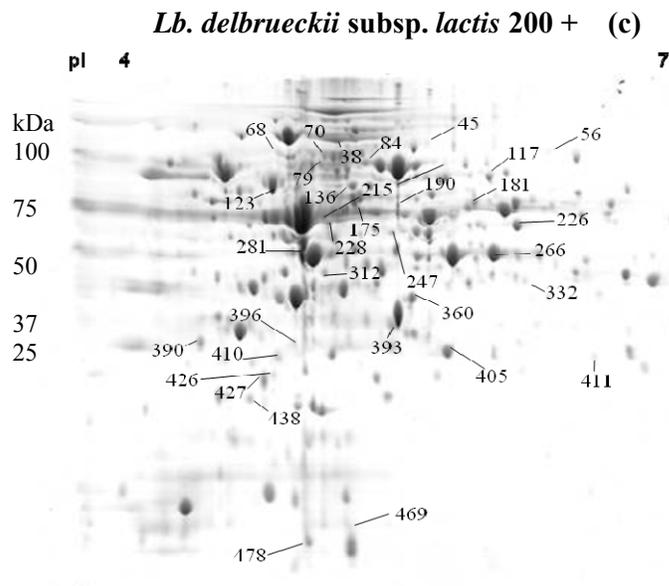


Figura 23. (Cont.) Geles 2D de los extractos citoplasmáticos obtenidos a mitad de la fase exponencial de crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (a y b) y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (c y d) crecidos en ausencia (a y c) o presencia (b y d) de sales biliares. Los *spots* identificados mediante huella peptídica se muestran en la Tabla 14.

Tabla 13. Proteínas cuya expresión resultó afectada por la exposición y adaptación a sales biliares en *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+. N = 3 para cada condición de crecimiento. Las letras en negrita indican las proteínas cuya expresión cambió en el derivado en ausencia de bilis (A: adaptación) y en la cepa original y el derivado en presencia de bilis (R: respuesta).

COG ^a	Spot ^b	Función putativa ^c	pI ^d	MM ^e	Cv ^f	Mo ^g	Norm. V ^h 200	Norm. V ^h 200b	Norm. V ^h 200+	Norm. V ^h 200+b	Adaptación		Respuesta	
											VF ⁱ 200+/200	VF ^j 200b/200	VF ^k 200+b/200+	
Metabolismo de carbohidratos	266	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (R)	5,51	36,7	15	176	1,500±0,880	4,750±0,250	1,250±0,060	3,500±0,630	0,83	3,17	2,80	
	84	Pyruvate kinase (A)	5,22	63,1	48	512	0,100±0,100	0,150±0,060	0,430±0,050	0,280±0,050	4,30	1,50	0,65	
	410	Fructose-bisphosphate aldolase (R)	4,90	33,2	24	107	0,130±0,070	0,017±0,017	0,100±0,020	0,033±0,030	0,77	0,13	0,33	
	322	HPr kinase/phosphorylase	5,32	35,2	45	465	0,013±0,013	0,025±0,025	-	-	na	1,92	na	
	326	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	6,42	33,9	26	256	0,005±0,005	0,010±0,010	-	-	na	2,00	na	
	123	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit	5,74	51,2	33	296	2,170±1,170	2,500±0,170	1,670±0,670	3,670±0,250	0,77	1,15	2,20	
	312	Phosphotransacetylase	5,05	35,6	38	301	0,110±0,020	0,250±0,030	0,110±0,010	0,190±0,010	1,00	2,27	1,73	
	79	Pyruvate oxidase (A)	4,96	67,7	30	263	0,200±0,003	0,310±0,030	0,100±0,100	0,380±0,150	0,50	1,55	3,80	
	281	D-lactate dehydrogenase	5,08	36,9	29	246	0,880±0,060	0,550±0,560	1,560±0,500	1,630±0,130	1,77	0,63	1,04	
393	Phosphoglycerate mutase (R,A)	5,24	26,1	47	204	0,033±0,025	0,210±0,050	0,120±0,090	0,260±0,060	3,64	6,36	2,17		
Metabolismo de lípidos	332	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (A)	5,78	36,6	27	248	0,012±0,012	0,011±0,010	0,027±0,012	0,034±0,006	2,25	0,92	1,26	
	226	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (R)	5,39	41,7	32	165	0,400±0,020	0,011±0,008	0,570±0,120	0,010±0,008	1,43	0,03	0,02	
	360	Enoyl-[acyl-carrier protein] reductase (NADH) (A)	5,23	27,1	29	228	0,180±0,140	-	0,440±0,040	-	2,44	na	na	
Biosíntesis de peptidoglicano/EPS	261	Glycosyltransferase (A)	4,86	37,2	26	123	0,010±0,010	0,020±0,020	0,160±0,160	0,260±0,140	16	2,00	1,63	
Metabolismo de aminoácidos	296	Branched-chain amino acid aminotransferase	5,15	38,0	26	89	0,025±0,025	0,100±0,090	-	-	na	4,00	na	
	247	Predicted tRNA methyltransferase	5,20	42,4	35	214	0,090±0,040	0,038±0,006	0,060±0,010	0,037±0,003	0,66	0,42	0,62	
	438	Peptide methionine sulfoxide reductase	4,69	19,9	32	119	0,056±0,016	0,031±0,031	0,089±0,006	0,106±0,003	1,59	0,55	1,19	
Metabolismo de nucleótidos	459	Adenylyl-sulfate (Thioredoxin) reductase	4,28	11,8	26	118	0,210±0,050	0,100±0,100	-	-	na	0,48	na	
	38	Adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside-triphosphate reductase (A)	5,02	82,5	23	220	0,040±0,040	0,030±0,030	0,520±0,280	0,250±0,240	13	0,75	0,48	

Estrés	181	Putative pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase (A)	6,13	48,7	49	285	0,430±0,040	0,460±0,060	0,200±0,040	0,240±0,020	0,47	1,07	1,20
	136	Putative pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase (A)	6,12	48,7	53	360	0,060±0,060	0,090±0,010	0,210±0,050	0,130±0,010	3,5	1,50	0,62
	411	Guanylate kinase (A)	5,62	22,9	21	194	0,069±0,050	-	0,013±0,013	-	0,19	na	na
	56	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones (A)	5,53	76,9	23	274	0,064±0,020	0,081±0,004	0,008±0,008	0,010±0,010	0,13	1,26	1,25
	228	ATP-dependent protease Clp, ATPase subunit (A)	5,03	46,5	32	149	0,043±0,043	0,071±0,069	0,160±0,040	0,190±0,040	3,72	1,65	1,19
	427	Protease subunit of ATP-dependent Clp protease (A,R)	4,96	21,3	36	153	0,160±0,020	0,860±0,020	0,300±0,020	0,870±0,080	1,88	5,38	2,90
	190	heat shock induced protein HtpO (A,R)	5,65	43,7	11	131	0,160±0,060	0,900±0,030	0,050±0,050	0,630±0,050	0,31	5,63	12,6
Traducción	478	10 kDa chaperonin GroES (R)	4,84	10,3	54	111	0,360±0,040	0,800±0,040	0,270±0,020	1,020±0,100	0,75	2,22	3,78
	390	Transcription elongation factor (A)	4,64	18,0	51	168	0,110±0,040	0,240±0,006	0,210±0,040	0,280±0,030	1,91	2,18	1,33
	429	Ribosome recycling factor	6,03	20,7	12	147	0,061±0,003	0,022±0,022	-	-	na	0,36	na
	365	Putative dipeptidyl-peptidase	5,21	32,2	31	134	0,038±0,019	0,081±0,050	-	-	na	2,13	na
	215	Elongation factor Tu (R)	4,85	43,3	47	191	0,910±0,090	0,360±0,180	1,270±0,550	0,640±0,550	1,40	0,40	0,50
	117	Asparagine-tRNA ligase (R)	5,03	50,2	26	212	0,075±0,050	0,350±0,100	0,100±0,100	0,280±0,004	1,33	4,67	2,80
	130	Glutamyl-tRNA synthetase	5,49	57,1	25	245	0,120±0,040	0,042±0,042	0,100±0,010	0,067±0,010	0,83	0,35	0,67
	175	Seryl-tRNA synthetase (A)	5,11	49,4	55	472	0,380±0,130	-	0,050±0,050	-	3,50	0,80	1,00
	68	Threonyl-tRNA synthetase (A)	5,05	72,9	23	221	0,380±0,130	-	0,050±0,050	-	0,13	na	na

^a COG: categoría funcional de acuerdo al Cluster of Orthologous Genes.

^b Números de los *spots* de proteínas escindidos de los geles correspondientes a la Figura 23.

^c Función putativa asignada según la enciclopedia KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes) (www.genome.jp/kegg).

^d Punto isoeléctrico teórico expresado en pH.

^e Masa molecular teórica expresada en kDa.

^f Porcentaje de cobertura de la secuencia. (Percentage of sequence coverage)

^g Puntaje de búsqueda de pesos moleculares (Molecular Weight search scores)

^h Volúmenes relativos normalizados (volumenes porcentuales) para relacionar los spots de la cepa original y el derivado resistente a bilis. Sólo se presentan los resultados estadísticamente significativos. Los valores son valores medios ± SD: $n \geq 3$ para cada cepa, -: no detectado.

ⁱ Factor de variación: relación entre los volúmenes normalizados para cada proteína derivada de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+) crecidos en caldo MRS sin sales biliares.

^{j,k} Factor de variación: relación entre los volúmenes normalizados para cada proteína derivada de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (j) o su derivado resistente a bilis (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+) (k) crecido en caldo MRS con 0,2% p/v de sales biliares (b) y la cepa correspondiente crecida sin bilis.

n.a.: no aplicable, debido a la ausencia de cantidades detectable de proteínas para algunas de las condiciones utilizadas para calcular el FV.

Finalmente vale la pena mencionar los cambios en la expresión de proteínas involucradas en respuesta al estrés general. Las chaperonas HtpO y GroES (Fig. 23 *spots* 190 y 478, respectivamente) y la proteasa Clp dependiente de la subunidad proteasa ATP (Fig. 23 *spot* 427) fueron altamente sobreexpresadas en presencia de sales biliares tanto en la cepa original como en el derivado resistente a bilis. La producción de 17 enzimas fue modificada de manera significativa y permanente en *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (fenómeno denominado **adaptación**). Dos enzimas del catabolismo de los azúcares fueron claramente sobreexpresadas en el derivado resistente a bilis: la piruvato quinasa y la fosfoglicerato mutasa (Tabla 14; Fig. 23 *spots* 84 y 393, respectivamente). La piruvato oxidasa, enzima del metabolismo del piruvato, resultó subexpresada (Tabla 14; Fig. 23 *spot* 79). La adquisición de resistencia permanente a bilis también promovió una marcada sobreexpresión de las enzimas glicosiltransferasa y glicerol 3-P dehidrogenasa. Ambas enzimas podrían tener impacto sobre las propiedades de superficie del derivado resistente a bilis. La presencia de bilis provocó mayor producción de las subunidades proteasa y ATPasa de la proteasa Clp dependiente de ATP en la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (Fig. 23 *spots* 228 y 427).

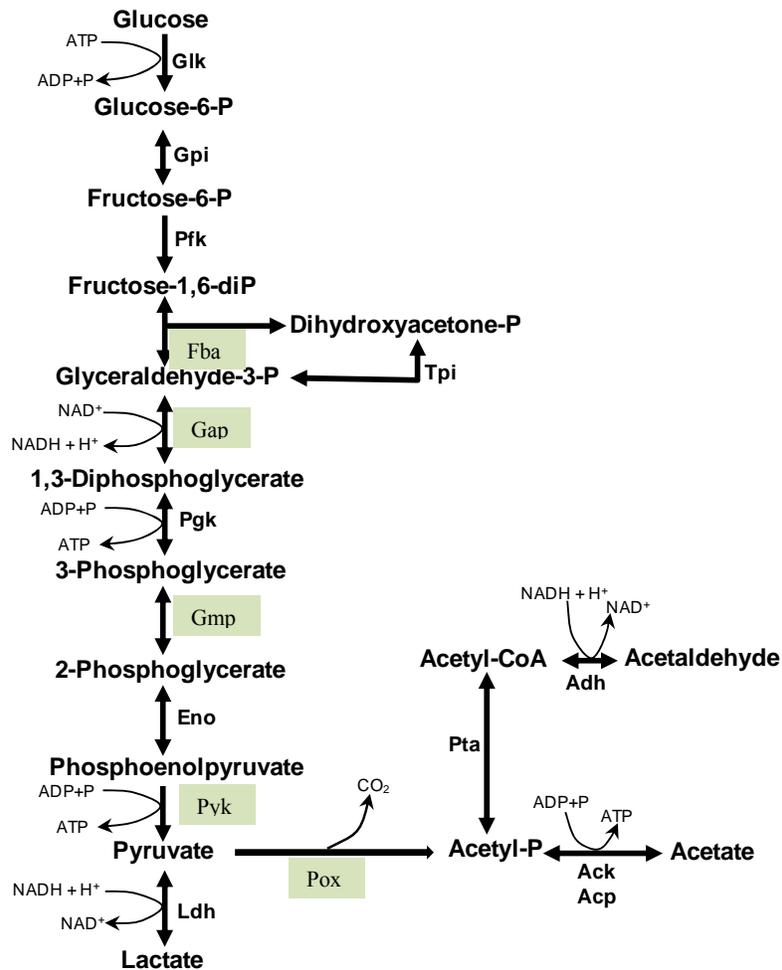


Figura 24. Representación de la vía homofermentativa y del metabolismo del piruvato en *Lb. delbrueckii* de acuerdo a la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>). Glk, glucoquinasa; Gpi, glucose-6-fosfato isomerasa; Pfk, 6-fosfofructoquinasa; Fba, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; Gap, gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa; Tpi, triosafosfato isomerasa; Pgk, fosfoglicerato quinasa; Gpm, fosfoglicerato mutasa; Eno, enolasa; Pyk, piruvato quinasa; Ldh, lactato dehidrogenasa; Pox, piruvato oxidasa; Pta, fosfato acetiltransferasa; Ack, acetato quinasa; Acp, acilfosfatasa; Adh, alcohol-acetaldehido dehidrogenasa. Las enzimas marcadas son aquellas cuya producción resultó modificada como respuesta y/o adaptación a bilis.

En la Figura 25 se muestra un esquema de las proteínas afectadas por la presencia de sales biliares. Se consideraron 4 categorías: metabolismo energético, respuesta a estrés, metabolismo lipídico y superficie celular.

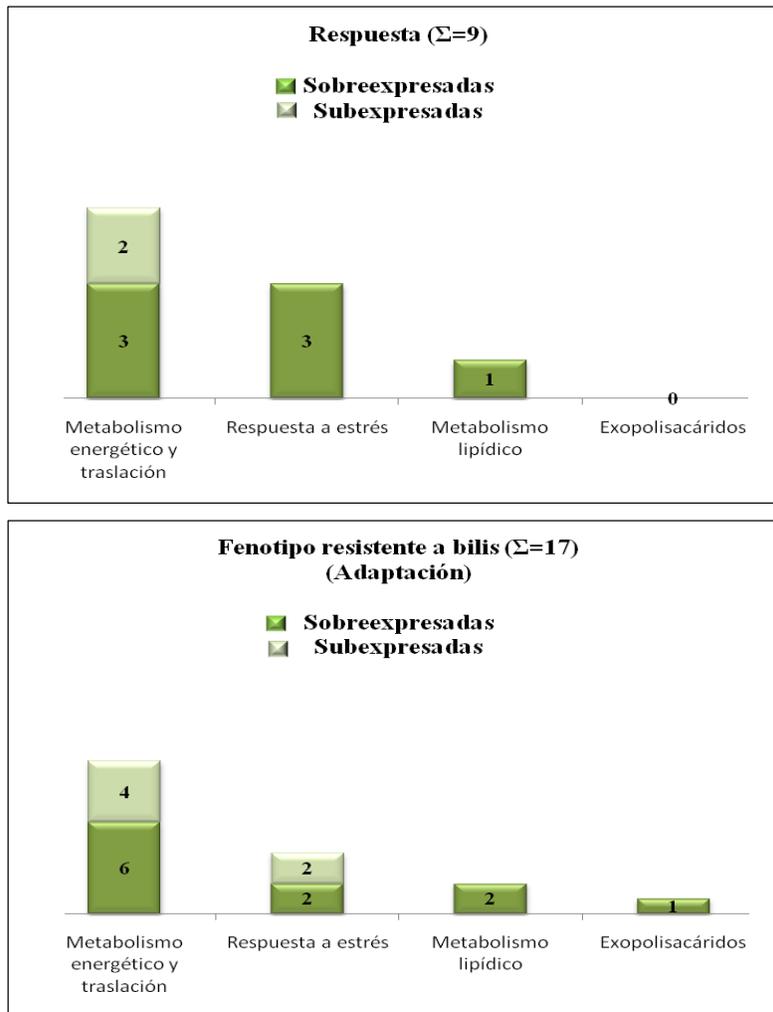


Figura 25. Histograma del número de proteínas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ cuya producción fue modificada por exposición a bilis. Las mismas están agrupadas en 4 categorías: metabolismo energético y traslación (incluye: metabolismo de carbohidratos metabolismo de nucleótidos y translación), respuesta a estrés (correspondiente a las categorías de plegamiento, ordenamiento y degradación del COG), metabolismo de lípidos, y síntesis de exopolisacáridos (correspondiente a la categoría de biosíntesis de peptidoglucano del COG). COG: Cluster of Orthologous Genes.

II.b.4.3 Modificación de la ruta glucolítica debido a la adquisición de resistencia a bilis

La presencia de bilis produjo cambios en la actividad de varias enzimas involucradas en el metabolismo central. Esto llevó a que se determinara la producción de los metabolitos finales de la vía glucolítica. El análisis mediante HPLC de los sobrenadantes libres de células en reposo incubadas en buffer con glucosa mostró mayor consumo de glucosa, mayor formación de ácido láctico y menor cantidad de ácido acético para la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (Tabla 15). Por lo tanto, el cociente ácido láctico/ácido acético se incrementó de manera significativa como consecuencia de la adquisición de resistencia a bilis.

Tabla 15. Consumo de glucosa y formación de ácidos orgánicos en una suspensión bufferada de células en reposo de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis 200+ desarrollados en caldo MRS.

Cepa	Media \pm SD (mM)			
	Glucosa consumida	Ácido láctico producido	Ácido acético producido	Cociente láctico/acético
<i>L. l.</i> 200	2,27 \pm 0,52 ^a	4,14 \pm 0,45 ^a	0,80 \pm 0,00 ^a	5,15 \pm 0,57 ^a
<i>L. l.</i> 200+	6,30 \pm 0,33 ^b	10,01 \pm 0,24 ^b	0,41 \pm 0,02 ^b	24,70 \pm 0,62 ^b

^{a, b} Los valores en columnas con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,001$). *L. l.* (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*).

II.b.5 Discusión

La bilis tiene la capacidad de desorganizar la estructura de la bicapa lipídica de las membranas celulares de bacterias Gram positivas, lo cual le confiere una fuerte actividad antimicrobiana. Los microorganismos que sobreviven a la acción de la bilis sufren cambios transitorios o permanentes que les permiten sortear los efectos deletéreos de estos compuestos. En este trabajo se identificaron las proteínas involucradas en la adaptación de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* a bilis.

Los cambios observados en la producción de enzimas de la vía glicolítica y del metabolismo del piruvato en *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* como respuesta a las sales biliares sugiere una activación de la glucólisis favoreciendo la formación de lactato, como se vió previamente para *Lb. acidophilus* mediante análisis de transcriptómica (Pfeiler y col., 2007). Como consecuencia directa, estaría incrementada la formación de ATP y la regeneración de NAD⁺, lo que permitiría a la célula tener energía suficiente para hacer frente al mayor consumo energético y al estrés impuesto por la adaptación a bilis. Lee y col. (2008a) reportaron la inducción en *Lb. reuteri* de 5 proteínas relacionadas a estrés involucradas en el metabolismo de los azúcares. Resultados similares fueron encontrados por Giard y col. (2001) para *Enterococcus faecalis*. Entre otras enzimas, Lee y col. (2008a) observaron inducción, asociada a bilis, de la enzima manitol-1-fosfato dehidrogenasa la cual cataliza la conversión de fructosa-fosfato a manitol-fosfato favoreciendo la formación del aceptor de electrones NAD⁺, como se vió en este estudio.

El análisis de la producción de metabolitos finales del catabolismo de los carbohidratos (lactato y acetato) por las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y 200+ reveló un incremento en el consumo de glucosa y formación de ácido láctico a expensas de ácido acético. Estos resultados sostienen la hipótesis de que existiría activación de la vía glicolítica como consecuencia de la adaptación a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Varios autores han informado previamente que existe activación de la glicólisis en BAL y bifidobacterias, con incremento en la producción de intermediarios ricos en energía bajo condiciones de estrés por bilis y ácido (Wilkins y col., 2001; Len y col., 2004a y b; Sánchez y col., 2005; Lee y col., 2008a).

La presencia de sales biliares indujo la producción de las proteínas chaperonas GroES, HtpO y de dos subunidades del complejo proteasa Clp dependiente de ATP en

ambas cepas. Van de Guchte y col. (2006) reportaron la presencia de genes en el genoma de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* involucrados en la resistencia a varios factores de estrés en otras bacterias. Una respuesta general a factores de estrés, tales como bilis y ácido, ha sido estudiada en otras especies relacionadas incluyendo *Ent. faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum* y *Lb. acidophilus* (Giard y col., 2001; Wilkins y col., 2001; Len y col., 2004b; Bron y col., 2006a; Lee y col., 2008a) y en bifidobacterias (Sánchez y col., 2005; 2007a y b, 2008).

Las proteínas de estrés como las HSPs (heat shock proteins) juegan diferentes roles en los sistemas vivos. Muchas HSPs actúan como proteínas chaperonas guiando los estados conformacionales para el correcto plegamiento, traslocación y ensamblaje de las proteínas (Horváth y col., 2008) contribuyendo también a la degradación de las proteínas dañadas por estrés (Streit y col., 2008). En nuestro trabajo, dos subunidades de la proteasa Clp resultaron inducidas en presencia de bilis. Frees e Ingmer (1999) sugirieron que los complejos proteolíticos de la Clp son esenciales para la supervivencia bajo condiciones adversas. Trabajos previos mostraron que las proteasas Clp resultaron inducidas por bilis en *Lb. acidophilus* y *Lb. reuteri* (Pfeiler y col., 2007; Whitehead y col., 2008) confirmando un rol importante de las proteínas chaperonas para contrarrestar los efectos perjudiciales de la bilis.

La presencia de bilis provocó la sobreexpresión de 2 proteínas relacionadas con la fisiología de la pared bacteriana: la glicosiltransferasa y la glicerol-3-fosfato dehidrogenasa. Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de una unidad de monosacárido desde un azúcar fosfato activado a una molécula receptora y pueden estar involucradas en la biosíntesis de peptidoglicanos y exopolisacáridos. La glicerol-3-fosfato dehidrogenasa participa en el metabolismo de los glicerolípidos y glicerofosfolípidos, importantes componentes de las membranas celulares. Ha sido demostrado que las sales biliares y otros factores de estrés ambientales provocan cambios en la composición de los ácidos grasos celulares y en las propiedades de superficie de lactobacilos y bifidobacterias (Guerzoni y col., 2001; Gómez-Zavaglia y col., 2002; Taranto y col., 2003; Ruiz y col., 2007). Por otro lado, se sabe que la bilis induce la síntesis de biofilm y EPS y algunos genes relacionados en bacterias entéricas (Hung y col., 2006; Ruas-Madiedo y col., 2009).

II.b.6 Conclusiones

La adaptación a sales biliares en *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 indujo cambios permanentes y transitorios en la cepa. Se identificaron 9 proteínas cuya expresión resultó regulada por la presencia de bilis (respuesta) y 17 proteínas cuya producción fue modificada de manera significativa y permanente en el derivado resistente a bilis (adaptación). Entre estas proteínas se encontraron chaperonas de respuesta general al estrés, proteínas involucradas en los procesos de transcripción y traslación, biosíntesis de peptidoglucanos y exopolisacáridos, metabolismo de nucleótidos y lípidos y varias enzimas que participan en la vía glucolítica y del catabolismo del piruvato. Estos resultados indican que la tolerancia a bilis en *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* implica varios mecanismos de respuesta a los efectos nocivos de las sales biliares en la fisiología bacteriana.

CAPÍTULO IIc

**Estudio *in vivo* de la interacción de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y *Lb.*
delbrueckii subsp. *lactis* 200+ con el intestino**

II.c.1 Introducción

La definición de bacterias probióticas establecida por la FAO/WHO en el 2002 no distingue el origen ni el tipo de microorganismo a ser considerado probiótico sino que destaca el hecho de que deba demostrarse *in vivo* la inducción de algún efecto benéfico. Se conoce que la administración oral de productos lácteos fermentados con cultivos starters tradicionales (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis*) es capaz de inducir numerosos efectos benéficos sobre la salud del consumidor, entre los que se encuentran la disminución de la intolerancia a la lactosa, la activación de la función inmune intestinal, la prevención de ciertas infecciones y cánceres intestinales y la disminución de la inflamación intestinal (Perdigón y col., 1988; Tejada-Simon y col., 1999; Meydani y Ha, 2000; Perdigón y col., 2000; Perdigón y col., 2001; Guarner y col., 2005). Algunos de estos efectos han sido reconocidos también para la administración de cultivos puros de las especies mencionadas, fuera de la matriz láctea fermentada que aporta muchos de los metabolitos bioactivos (lactasa, péptidos, exopolisacáridos, sustancias antimicrobianas excretadas al medio de fermentación). Muchos estudios demuestran el efecto benéfico de las bacterias del yogur (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *St. thermophilus*) contra ciertos desórdenes intestinales (Fuller, 1991; Goldin, 1998; de Moreno de LeBlanc y Perdigón, 2004; Guarner y col., 2005). Específicamente, en relación al posible rol probiótico de cultivos starters como *Lb. delbrueckii*, Perdigón y col. (1986) reportaron su capacidad de activar macrófagos peritoneales, lo que sugiere que estas bacterias, una vez atravesado el estómago llegan al intestino donde pueden modular la función inmune. Estas observaciones fueron confirmadas después por el mismo grupo (Perdigón y col., 1999) cuando reportaron que la administración oral de una cepa de esta especie indujo un incremento en el número de células productoras de IgA en la lámina propia de intestino delgado de ratones.

II.c.2 Objetivo

El objetivo de esta última parte del trabajo fue investigar el impacto de la adaptación a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente sobre la interacción con el intestino y la capacidad de activar la respuesta inmune.

II.c.3 Materiales y Métodos

II.c.3.1 Cepas y animales de experimentación

Las cepas utilizadas en esta parte del estudio fueron *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+. La cepa original se cultivó en caldo MRS a 37°C durante 18 hs y el derivado resistente a bilis en caldo MRS adicionado de 0,5% (p/v) de sales biliarias bovinas (Sigma).

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad provenientes de la colonia cerrada del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL), de la ciudad de Esperanza (a 30 Km de Santa Fe). Este establecimiento cuenta con la certificación y controles periódicos del ANMAT y SENASA. Los animales fueron transportados al Bioterio del INLAIN en cajas de transporte provistas por el Bioterio de origen y en un lapso menor a una hora, minimizando las condiciones de estrés durante el transporte. Los animales se alojaron en grupos de 5 ratones en jaulas de plástico transparentes (Gilarioni, Buenos Aires), con cama de viruta de madera irradiada (Horacio Cabañas, Buenos Aires) en la sala de mantenimiento del Bioterio del INLAIN que cuenta con control automático de temperatura ($21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz/oscuridad (12hs/12hs) y renovación automática total de 20 volúmenes de aire por hora. Los animales se dejaron por un período de aclimatación de 7 días antes de comenzar las experiencias. Los animales recibieron *ad libitum* agua de red y alimento convencional (Cooperación, Buenos Aires). Los mismos fueron mantenidos y tratados de acuerdo a la guía para el uso y cuidado de animales de experimentación del National Institute of Health (NIH, USA).

II.c.3.2 Microscopía electrónica

El efecto de la bilis sobre la morfología celular de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado desarrollado en MRS en presencia de 0,5% (p/v) de sales biliarias se estudió por microscopía electrónica de barrido y transmisión. Cultivos frescos se centrifugaron (8.000 g, 10 min, 5°C) se resuspendieron en buffer PBS y se enviaron refrigerados al Servicio de Microscopía Electrónica del INSIBIO-CONICET (Tucumán) para su tratamiento. El tiempo transcurrido entre la obtención, envío y procesamiento de la muestra fue menor a 20 hs.

II.c.3.3 Cinética de crecimiento en presencia de sales biliares bovinas y porcinas

Con el objeto de comparar el crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ en presencia de sales biliares bovinas y porcinas, se realizó la cinética de crecimiento en caldo MRS conteniendo 0,5% (p/v) de sales biliares bovinas (B3883, Sigma) y 0,15%, 0,30% y 0,5% (p/v) de sales biliares porcinas (B8631, Sigma). Se determinó la densidad óptica periódicamente como medida del desarrollo.

II.c.3.4 Deconjugación de ácidos biliares

Se determinó la capacidad de las cepas de deconjugar sales biliares específicas de acuerdo al método de Taranto y col. (1995). Los medios de cultivo se prepararon adicionando a MRS agar antes del autoclavado, 0,5% (p/v) de los siguientes ácidos/sales biliares (Sigma): T4009: ácido taurocólico; T0875: ácido taurodesoxicólico; T6260: tauroquenodesoxicolato de sodio; G0759: glicoquenodesoxicolato de sodio; G2878: ácido glicocólico hidratado; G7132: glicocolato de sodio hidratado. El medio se autoclavó a 121°C durante 15 min y se prepararon las placas, conservándolas en la oscuridad. Cultivos frescos de las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 desarrollado en caldo MRS y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ desarrollado en MRS-bilis bovina (0,5% p/v) se estriaron en los medios de cultivo conteniendo sales biliares individuales y se incubaron en anaerobiosis durante 72 hs a 37°C. Como controles positivos se utilizaron las cepas *Lactobacillus acidophilus* A9 y *Lb. acidophilus* CSL.

II.c.3.5 Hidrofobicidad

Se determinó como se explicó previamente en el capítulo IIa pero esta vez a partir de cultivos frescos de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 en caldo MRS y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ en caldo MRS con 0,5% (p/v) de sales biliares bovinas (Sigma).

II.c.3.6 Ensayo de adhesión a líneas celulares intestinales epiteliales

Se determinó la capacidad de adhesión de las cepas a la línea celular intestinal epitelial HT29-MTX, la cual es capaz de producir mucina de manera constitutiva (Lesuffleur y col., 1993). La línea celular se mantuvo en medio DMEM suplementado

con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor y una mezcla de antibióticos para alcanzar una concentración final de 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de gentamicina y 1,25 µg/ml de anfotericina B. Todos los medios y reactivos fueron adquiridos en Sigma y las condiciones de incubación se realizaron en estufa de CO₂ (SL Waterjacketed CO₂ Incubator- Sheldon Mfg. Inc., Cornelius, Oregon, USA) a 37°C, 5% CO₂. Los medios de cultivos se renovaron cada dos días y las líneas celulares se tripsinaron semanalmente con una solución de Tripsina-EDTA (0,25% tripsina, 0,02% EDTA) (Sigma) según procedimientos estándares. Para los experimentos se sembraron 1x10⁵ células/ml en placas de 24 pocillos y se incubaron hasta lograr confluencia durante 13 ± 1 día. La línea celular se usó entre los pases 26 y 28.

Las suspensiones bacterianas se obtuvieron por cultivos de 18 hs de la cepa original y su derivado resistente a bilis en caldo MRS con diferentes concentraciones de sales biliares. El derivado resistente a bilis se cultivó en MRS con 0%, 0,3% y 0,5% (p/v) de bilis, mientras que la cepa original se cultivó en MRS con 0%, 0,1% y 0,2% (p/v) de bilis. Se eligieron estas concentraciones de sales biliares para lograr una capacidad inhibitoria de la bilis relativamente similar en ambas cepas. Las células se recolectaron por centrifugación (8.000 g, 10 min, 5°C), se lavaron 2 veces con buffer PBS y se resuspendieron en medio DMEM sin antibióticos a una concentración de 1x10⁸ UFC/ml. Las monocapas de HT29-MTX se lavaron 2 veces con buffer PBS Dubelco's (Sigma) para eliminar los antibióticos y luego se adicionaron las suspensiones celulares en una relación célula epitelial/bacteria de 1:10. Las placas se incubaron durante 1h a 37°C, 5% CO₂ en estufa Heracell® 204 (Thermo Electron LDD GmbH, Langensfeld, Alemania). Luego del período de incubación, se eliminó el sobrenadante y los pocillos se lavaron 3 veces con buffer PBS Dubelco's para eliminar las bacterias no adheridas. Finalmente, se tripsinaron las monocapas y se realizaron recuentos de bacterias adheridas en MRS agar. Los resultados se expresaron como el porcentaje de bacterias adheridas con respecto al número de bacterias agregadas.

II.c.3.7 Capacidad de autoagregación

Se obtuvieron cultivos frescos (18 hs) de la cepa original en caldo MRS y del derivado resistente a bilis en caldo MRS y en caldo MRS + 0,5% (p/v) de bilis bovina.

Las células se centrifugaron (8.000 g, 10 min, 5°C), se lavaron 2 veces con buffer PBS pH 7,4 y se resuspendieron en el mismo buffer hasta una concentración aprox. de 1×10^8 UFC/ml. Las suspensiones celulares se agitaron vigorosamente en vórtex y se dejaron reposar a temperatura ambiente. El fenómeno de autoagregación (agregación macroscópica de las células y precipitación de flóculos) se observó durante 30 minutos y se registró fotográficamente.

II.c.3.8 Coagregación con microorganismos patógenos

Se obtuvieron cultivos frescos de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 en caldo MRS y de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OMS-Ca en caldo TS (Britania). Se obtuvo el pellet de un cultivo overnight de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 a partir de 1 y 10 ml del cultivo fresco mediante centrifugación (5.000 g, 10 min, 4°C) y lavado con buffer PBS. El cultivo de *S. enterica* serovar Typhimurium se lavó (5.000 g, 10 min, 4°C, PBS) y se llevó a $D.O._{560\text{ nm}} = 0,5$ con buffer PBS. Se resuspendieron los pellets obtenidos con 2 ml de la suspensión de *Salmonella*. La suspensión *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200/*S. enterica* serovar Typhimurium OMS-Ca se agitó y se dejó a temperatura ambiente durante 3 hs para la coagregación y precipitación de flóculos. Se realizaron recuentos de *S. enterica* serovar Typhimurium tomando la muestra en la parte superior del tubo de ensayo donde ocurría la agregación, a tiempo 0, 1, 2 y 3 hs en agar ABRV (Britania). Las placas se incubaron durante 24 hs a 37°C en aerobiosis.

II.c.3.9 Sobrevida en fluido intestinal de ratón

Teniendo en cuenta el principio de las 3R's (reducción, refinamiento y reemplazo) que debe tenerse en cuenta en experimentación animal, el fluido intestinal de ratones convencionales se obtuvo de animales controles de las experiencias descritas en el ítem II.c.3.1. Animales convencionales se anestesiaron de forma intraperitoneal con un cocktail de ketamina (50 mg/ml)/xilacina (20 mg/ml)/acepromacina (10 mg/ml) y se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo el intestino delgado y se colocó inmediatamente en baño de buffer PBS a 5°C. Se recogió el contenido intestinal lavando el intestino con 2 ml de agua destilada estéril. Se recogió el fluido, se centrifugó (8.000 g, 15 min, 4°C) y se esterilizó por filtración (0,45

y 0,22 micrones, Millipore, San Pablo, Brasil). El fluido intestinal se alicuotó y se mantuvo a -76°C hasta su empleo. Cultivos overnight (1 ml) de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 en caldo MRS y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ en caldo MRS con 0,5% (p/v) de sales biliares bovinas (Sigma) se centrifugaron y lavaron 2 veces con buffer PBS. Los cultivos centrifugados, una vez descartado el sobrenadante, se resuspendieron en fluido intestinal a una concentración de 10^8 UFC/ml. Las suspensiones celulares se incubaron a 37°C en baño de agua y se determinó la viabilidad celular (recuentos en medio agarizado) luego de 2, 4, 6 y 24 hs de incubación.

II.c.3.10 Interacción de bacterias con el intestino. Empleo de bacterias marcadas fluorescentes

Cultivos frescos de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 en caldo MRS y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ en caldo MRS con 0,5% (p/v) de sales biliares bovinas (Sigma) se centrifugaron (8.000 g, 10 min, 4°C) y se lavaron 2 veces con buffer PBS para resuspenderse en el volumen de partida. Las suspensiones celulares se adicionaron de Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, Sigma, 2 mg/ml), capaz de ligarse de forma irreversible por reacción con los puentes disulfuro presentes en la pared celular y se incubaron durante 30 min a 37°C. Los cultivos se centrifugaron y se lavaron con buffer PBS (mínimo 6 veces) hasta la eliminación completa del agente fluorescente (sobrenadante límpido, no amarillo). Se corroboró que la marcación fluorescente no alterase la viabilidad ni la hidrofobicidad de las células.

Ratones BALB/c (3 animales por grupo) recibieron 10^8 células marcadas por intubación intragástrica (0,2 ml). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical luego de 10, 30 ó 60 min de recibir las bacterias marcadas. Se extrajo la porción distal del intestino delgado para su procesamiento histológico, inclusión en parafina y realización de cortes histológicos. Los cortes histológicos se desparafinaron en un gradiente de xilenos/alcoholes/buffer y se analizaron (muestras codificadas analizadas por un operador que no conocía la codificación) mediante microscopia de fluorescencia (Microscopio Nikon eclipse E200 equipado con lámpara de Hg).

II.c.3.11 Determinación de la capacidad de activar la respuesta inmune: actividad fagocítica de macrófagos peritoneales y número de células productoras de IgA en intestino

II.c.3.11.i Administración oral de las cepas en estudio

Cultivos frescos de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 en caldo MRS y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ en caldo MRS con 0,5% (p/v) de sales biliares bovinas (Sigma) se centrifugaron (8.000 g, 10 min, 4°C) y se lavaron 2 veces con buffer PBS. Los animales recibieron, por intubación intragástrica y por 3, 6 y 10 días consecutivos, aprox. 5×10^7 UFC de cada cepa. A lo largo de la experiencia se midió el consumo de agua y se monitoreó el peso y el estado sanitario de los animales mediante la observación del estado del pelaje, actividad, agresividad y comportamiento de grupo como medidas preliminares de la seguridad oral de la administración de las cepas en la dosis elegida.

II.c.3.11.ii Seguridad: traslocación bacteriana

Al final de cada período de alimentación, los animales fueron pesados, anestesiados y sacrificados por dislocación cervical, extrayéndose macrófagos peritoneales, hígado e intestino delgado. Se registró el peso del hígado y se realizó un homogenato del mismo en 5 ml de buffer PBS estéril. 1 ml del homogenato se sembró en profundidad en agar ABRV (Britania) y las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en aerobiosis (Vinderola y col., 2005).

II.c.3.11.iii Ensayo de fagocitosis de macrófagos peritoneales

Los macrófagos peritoneales se extrajeron de la cavidad peritoneal por lavado con 5 ml de buffer PBS + heparina sódica (0,1% v/v) (Heparin, 5000 UI/ml) + BSA (0,3% p/v) (Sigma) y se conservaron en baño de hielo en recipientes plásticos (por su capacidad de adhesión al vidrio). La suspensión se centrifugó (500 g, 10 min, 5°C), se lavó dos veces con la solución de extracción y se ajustó a 1×10^6 células/ml con cámara de Neubauer. Se verificó que la viabilidad sea > 95 % mediante tinción de exclusión con azul tripan (Sigma). 100 µl de esta suspensión de macrófagos se puso en contacto (30 min, 37°C) con 100 µl de una suspensión de *Candida albicans* (1×10^7 células/ml)

inactivada por calor, previamente opsonizada (10:1) con suero sanguíneo de ratón, durante 15 min a 37°C. El porcentaje de fagocitosis se determinó como el porcentaje de macrófagos que habían adherido o incorporado una o más células de levadura mediante observación microscópica (40x) de 200 macrófagos (Vinderola y col., 2005).

II.c.3.11.iv Examen histológico de la mucosa intestinal

Muestras de intestino delgado (zona del íleo) se fijaron en solución de formaldehído (10%) bufferada y se siguió la técnica de Sainte-Marie (1962) para inclusión en parafina. Cortes histológicos (3-4 μm) se desparafinaron, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron mediante microscopía óptica para el estudio de la arquitectura intestinal y la observación de síntomas de inflamación intestinal o daño tisular (Vinderola y col., 2005).

II.c.3.11.v Estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado

En cortes histológicos de intestino delgado, obtenidos según lo descrito en el ítem anterior, se determinó el número de células productoras de IgA, en lámina propia, mediante inmunofluorescencia directa empleando un anticuerpo monoespecífico anti-cadena α de IgA de ratón (Sigma-Aldrich) conjugado con isotiocanato de fluoresceína (Vinderola y col., 2005). Luego de la incubación de las muestras histológicas con el anticuerpo, se contó el número de células fluorescentes (microscopía de fluorescencia, 40x) y se expresó el resultado como N° de células IgA+/10 campos observados.

II.c.3.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 15.0 para Windows (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., 2006). Para los resultados de adhesión se realizaron tests ANOVA independientes utilizando como factor la concentración de bilis. Las diferencias entre las tres concentraciones de bilis ensayadas para cada cepa se analizaron mediante comparación de medias LSD (least-significant difference, $p < 0,05$). Los datos obtenidos en los ensayos *in vivo* se analizaron utilizando un test ANOVA de un factor asumiendo varianzas iguales (pruebas de Tukey y de Duncan). El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

II.c.4 Resultados

II.c.4.1 Microscopía electrónica

Por microscopía electrónica de barrido (Fig. 26) se observó que las células del derivado resistente a bilis (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+) desarrolladas en presencia de sales biliares presentaron una morfología elongada respecto a la cepa original (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200).

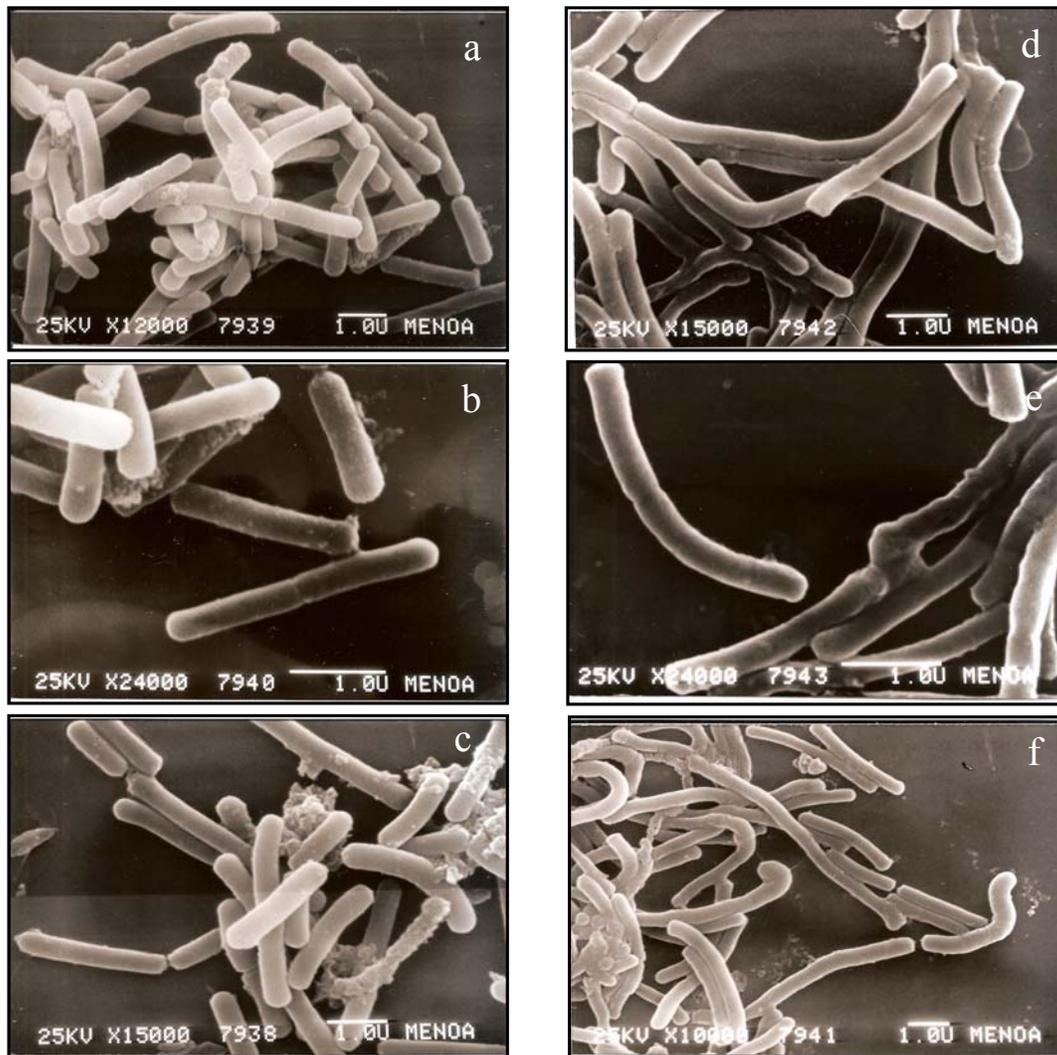


Figura 26. Microscopía electrónica de barrido de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (a, b, c), desarrollado en caldo MRS y de su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (d, e, f), desarrollado en caldo MRS + 0,5% (p/v) de sales biliares.

Por otro lado, la microscopía de transmisión (Fig. 27) permitió observar una desorganización de la membrana celular evidenciada por los cambios morfológicos de la misma (irregularidad en su trazado).

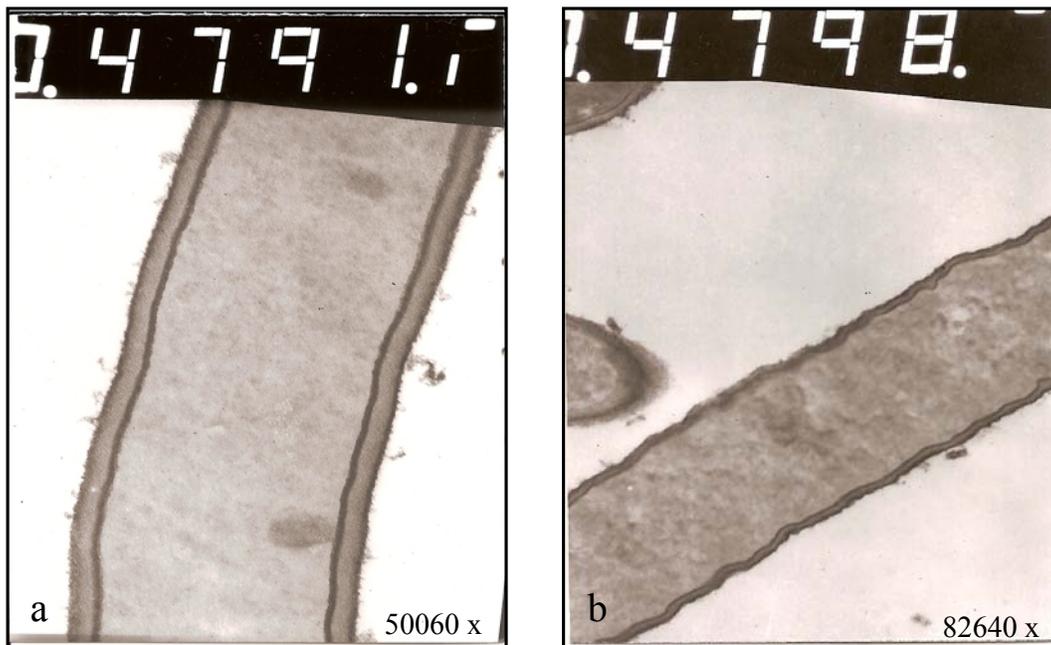


Figura 27. Microscopía electrónica de transmisión de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (a), desarrollado en caldo MRS y de su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (b), desarrollado en caldo MRS + 0,5% (p/v) de sales biliares.

II.c.4.2 Cinética de crecimiento en presencia de sales biliares bovinas y porcinas

La Figura 28 muestra el crecimiento del derivado resistente a bilis en presencia de sales biliares de origen bovino y porcino. No se observó desarrollo en presencia de 0,3% y 0,5% de sales biliares porcinas. La posibilidad de desarrollo en presencia de 0,5% de bilis bovina se correspondió con 0,15% de bilis porcina. Luego de 8 hs de incubación los recuentos de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ desarrollado en MRS-bilis bovina (0,5% p/v) fueron de $2,67 \times 10^7$ UFC/ml y de $2,14 \times 10^7$ UFC/ml en bilis porcina (0,15% p/v).

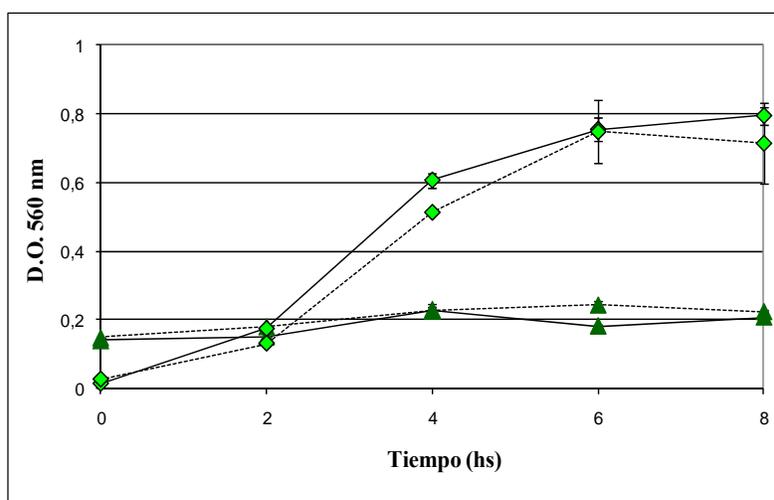


Figura 28. Cinética de crecimiento de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (▲) y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (◆) en caldo MRS-bilis bovina (0,5% p/v) (línea continua) y en caldo MRS-bilis porcina (0,15% p/v) (línea punteada).

II.c.4.3 Deconjugación de ácidos biliares

En relación a la capacidad de deconjugación de sales biliares, se observó que el derivado resistente a bilis fue capaz de crecer en presencia de los ácidos taurodesoxicólico y glicocólico hidratado, y de la sal tauroquenodesoxicolato de sodio, a diferencia de la cepa original que no fue capaz de hacerlo (Tabla 16). Sin embargo, no fue capaz de deconjugar ácidos biliares específicos como lo hicieron las cepas de referencia *Lb. acidophilus* A9 y CSL.

II.c.4.4 Hidrofobicidad

Se determinó la hidrofobicidad de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 desarrollado en caldo MRS y de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ desarrollado en caldo MRS adicionado de 0,5% (p/v) de sales biliares bovinas. En el capítulo IIa no se habían observado diferencias significativas en la hidrofobicidad de la cepa original y el derivado resistente cuando ambas fueron desarrolladas en caldo MRS. Sin embargo, en presencia de sales biliares, la hidrofobicidad del derivado resistente *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ fue significativamente menor ($23,1 \pm 5,9\%$) a la de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 ($68,9 \pm 6,1\%$) desarrollado en MRS.

Tabla 16. Deconjugación de ácidos biliares específicos.

Cepa	Ácido/Sal biliar					
	Taurocólico	Taurodesoxicólico	Tauroqueno-desoxicolato de sodio	Glicoqueno-desoxicolato de sodio	Glicocólico hidratado	Glicocolato de sodio hidratado
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 200	C N/D	N/C	N/C	N/C	N/C	C N/D
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 200+	C N/D	C N/D	C N/D	N/C	C N/D	C N/D
<i>Lb. acidophilus</i> A9	C D	C D	C+ N/D	N/C	C+ N/D	C+ N/D
<i>Lb. acidophilus</i> CSL	C D	C D	C+ N/D	N/C	C+ N/D	C+ N/D

C: crece (C+: más desarrollado que las demás cepas); D: deconjugas; N/C: no crece; N/D: no deconjugas.

II.c.4.5 Ensayo de adhesión a líneas celulares intestinales epiteliales

Al comparar la adhesión de las cepas *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* 200 y 200+ a la línea celular intestinal HT29-MTX se observó que ambas cepas, original y derivado, mostraron elevados valores de este parámetro. Sin embargo, el proceso de adaptación a bilis disminuyó de forma permanente la capacidad de adhesión del derivado resistente respecto a la cepa original. Además, se observó una notable disminución en la capacidad de adhesión cuando ambas cepas fueron previamente desarrolladas en presencia de bilis (Fig. 29).

II.c.4.6 Capacidad de autoagregación

La Figura 30 muestra la cinética visual de autoagregación de las cepas en estudio en buffer PBS. Este fenómeno no se pudo estudiar por espectrometría ya que la formación de flóculos de autoagregados inducía la emisión de señales de error en el equipo. Se observó que la gran capacidad autoagregante de la cepa original fue parcialmente perdida en el derivado resistente al desarrollar en medio líquido con bilis. Este fenómeno se observó solo en presencia de bilis ya que no se observaron diferencias entre la cepa original y el derivado resistente en ausencia de bilis (fotos no mostradas).

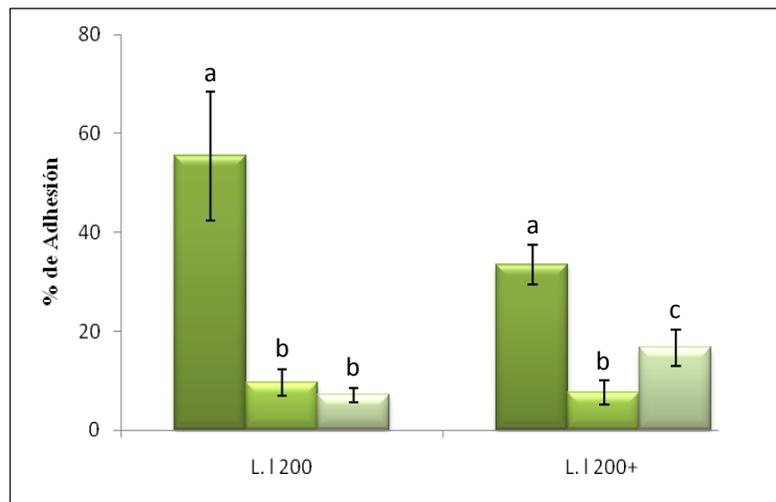


Figura 29. Adhesión de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (L. 1 200) y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (L. 1 200+) a la línea celular intestinal HT29-MTX. (■) MRS, (■) MRS+0,1% ó 0,3% de bilis para las cepas 200 y 200+, respectivamente; (■) MRS + 0,2% ó 0,5% de bilis para las cepas 200 y 200+, respectivamente. Para cada cepa las barras con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

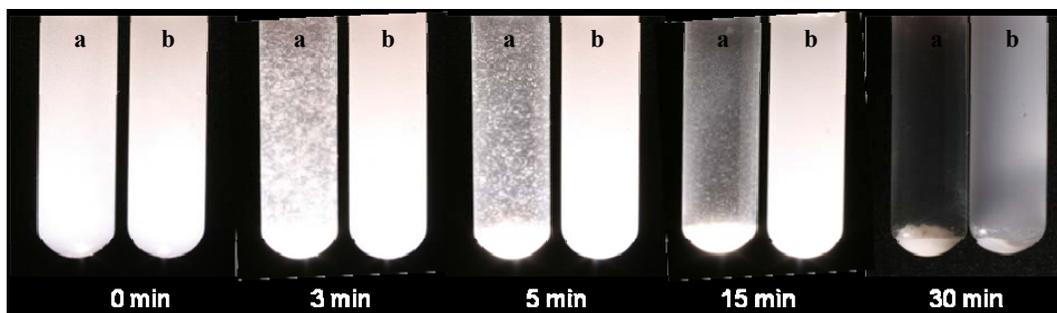


Figura 30. Cinética visual de autoagregación de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (a) y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (b) en buffer PBS durante 30 minutos.

II.c.4.7 Coagregación con microorganismos patógenos

La capacidad de coagregación de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 con el patógeno intestinal *S. enterica* serovar Typhimurium OMS-Ca se observa en la Tabla 17. No se observaron diferencias significativas en los recuentos de *Salmonella* en el medio de coagregación, lo que indica que las cepas *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y *S. enterica* serovar Typhimurium OMS-Ca no fueron capaces de coagregar.

Tabla 17. Coagregación de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 con *S. enterica* serovar Typhimurium OMS-Ca.

Condición	Recuento de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium OMS-Ca en el medio de coagregación a tiempo (hs)			
	0	1	2	3
Control (<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium OMS-Ca)	8,35 ± 0,23	7,97 ± 0,16	7,79 ± 0,04	7,85 ± 0,08
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 200 (pellet de 1 ml) + (<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium OMS-Ca)	-	7,82 ± 0,05	7,90 ± 0,09	8,04 ± 0,07
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 200 (pellet de 10 ml) + (<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium OMS-Ca)	-	8,01 ± 0,04	7,89 ± 0,15	8,11 ± 0,07

II.c.4.8 Sobrevida en fluido intestinal de ratón

La Figura 31 muestra la sobrevida de las cepas en estudio suspendidas en fluido intestinal de ratón. Se registraron diferencias significativas en los órdenes log de pérdida de viabilidad celular para las 6 y 24 hs de incubación. Se observó una mayor resistencia al ambiente intestinal en *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (crecida en MRS-bilis) en relación a la cepa original.

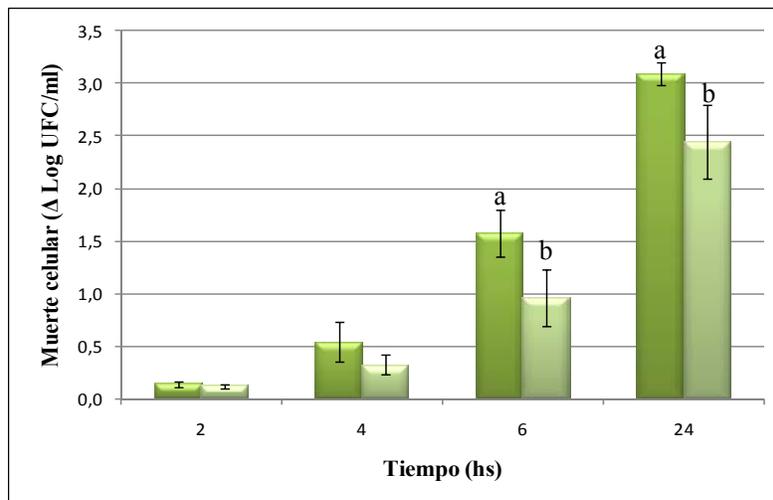


Figura 31. Sobrevida en fluido intestinal de ratón (diferencia en órdenes log entre el recuento celular a tiempo cero y el tiempo n) de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (■) y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (■) luego de 2, 4, 6 y 24 hs de incubación. ^{a, b} Columnas con diferente superíndice (para cada tiempo) son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

II.c.4.9 Interacción de bacterias con el intestino. Empleo de bacterias marcadas fluorescentes

Mediante microscopía de fluorescencia se estudió la interacción con el intestino delgado de las cepas en estudio empleando células viables marcadas con FITC (Figs. 32, 33 y 34). Esta metodología permitió verificar que la mayor capacidad autoagregante de la cepa *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 observada *in vitro*, se confirmó *in vivo* durante el tránsito intestinal. Luego de 10 min de intubación, se observaron “clusters” o autoagregados de células recorriendo el lumen intestinal (Fig. 32a) y adheridos a la superficie de las vellosidades intestinales (Figs. 32b, c y d) en íntimo contacto con la monocapa de células epiteliales que las recubren. Se observaron también células o restos celulares marcados internalizados en la lámina propia de las vellosidades (Fig. 32c) y en las placas de Peyer. En cuanto al derivado resistente a bilis, se verificó, en coincidencia con el estudio *in vitro*, una menor capacidad autoagregante de la cepa *in vivo*, observándose que las células recorrieron el lumen intestinal de forma más dispersa (Fig.

32e) y en autoagregados de menor tamaño. También se observó, cualitativamente, una menor cantidad de células adheridas al epitelio intestinal (Fig. 32f). Por el contrario, se observó una mayor cantidad de células internalizadas en la lámina propia de las vellosidades intestinales para el derivado resistente a bilis (Fig. 32g). Luego de 30 min de la administración intragástrica se observaron aún células de la cepa original adheridas al epitelio (Fig. 33a), no tanto así para el derivado resistente a bilis (Fig. 33d). En ambos casos se observaron células internalizadas en vellosidades (Figs. 33b y e) y placas de Peyer (Figs. 33c y f). Finalmente, luego de 60 min de la administración de bacterias marcadas, se observaban aún autoagregados (un poco más dispersos por acción del tránsito intestinal) de la cepa original (Fig. 34a) y células adheridas al epitelio intestinal (Fig. 34b), no así del derivado resistente a bilis (Figs. 34d y e). En ambos casos se observaron restos celulares internalizados en placas de Peyer (Figs. 34c y f), muy probablemente interactuando con células inmunes.

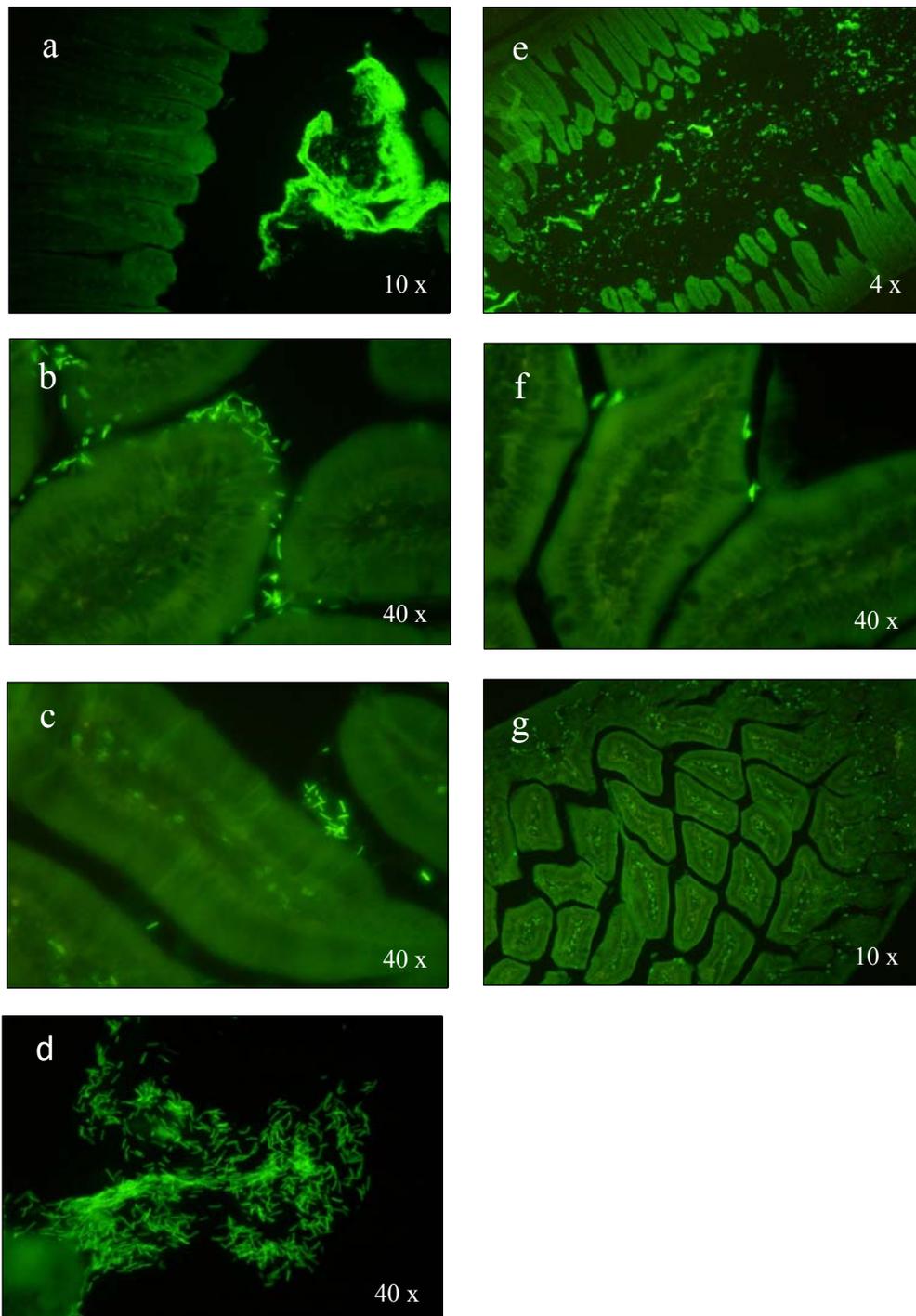


Figura 32. Interacción con el intestino de células marcadas (con FITC) de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (a, b, c, d) (desarrollado en caldo MRS) y de su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (e, f, g) (desarrollado en caldo MRS + 0,5% p/v de sales biliares) luego de 10 min de la administración oral a ratones.

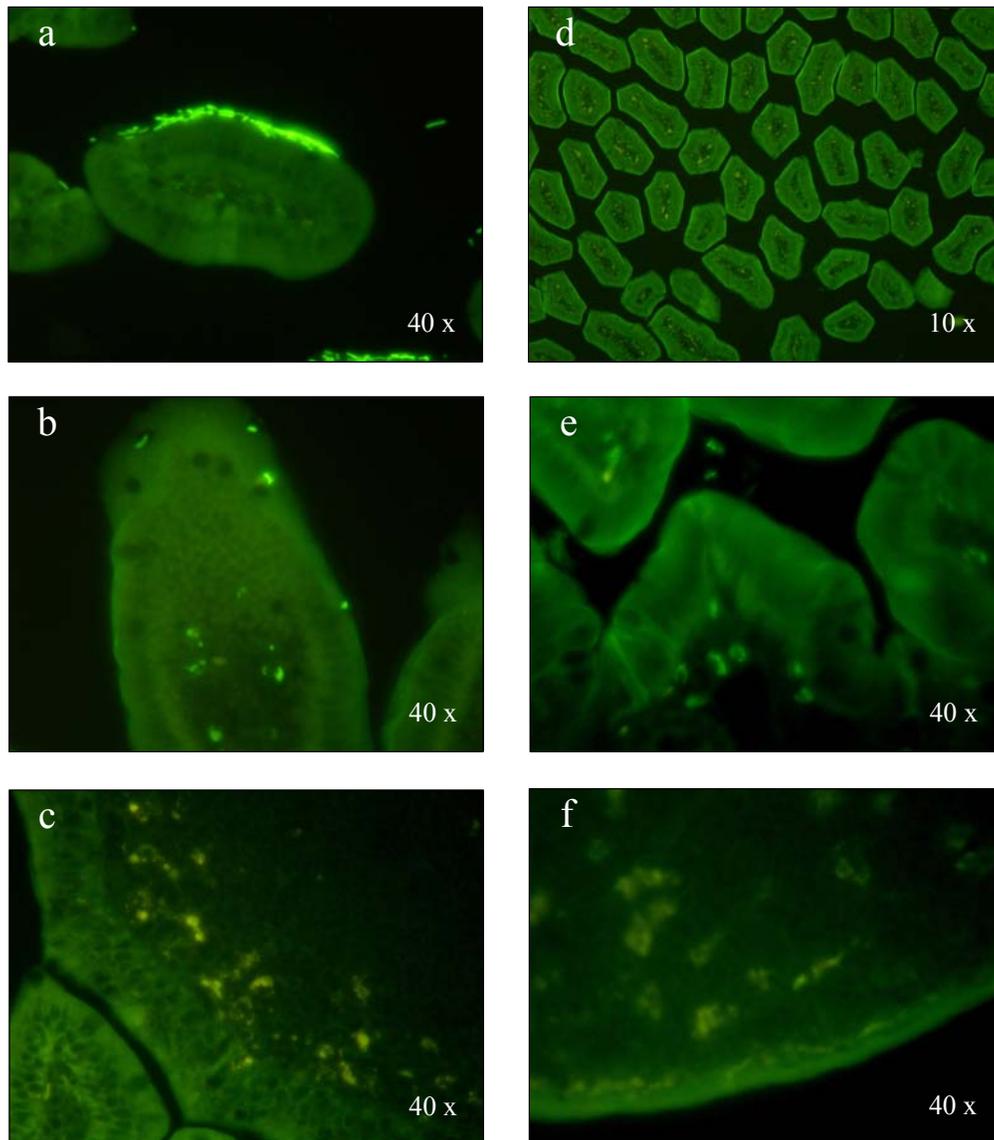


Figura 33. Interacción con el intestino de células marcadas (con FITC) de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (a, b, c) (desarrollado en caldo MRS) y de su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (d, e, f) (desarrollado en caldo MRS + 0,5% p/v de sales biliares) luego de 30 min de la administración oral a ratones.

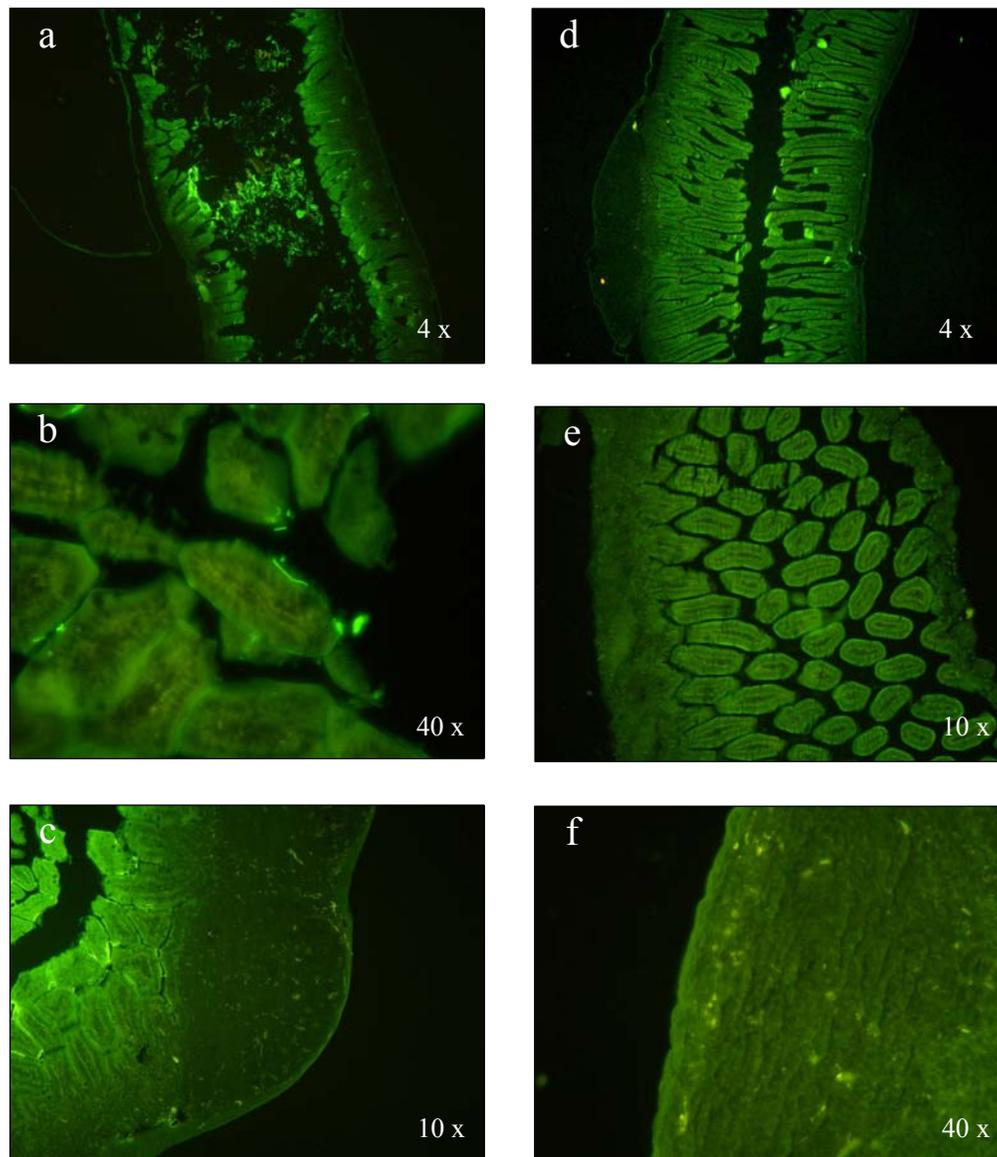


Figura 34. Interacción con el intestino de células marcadas (con FITC) de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (a, b, c) (desarrollado en caldo MRS) y de su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (d, e, f) (desarrollado en caldo MRS + 0,5% p/v de sales biliares) luego de 60 min de la administración oral a ratones.

II.c.4.10 Determinación de la capacidad de activar la respuesta inmune: actividad fagocítica de macrófagos peritoneales y número de células productoras de IgA en intestino

Para el estudio *in vivo* de la capacidad de activar la respuesta inmune de la mucosa intestinal mediada por IgA, los animales recibieron cultivos frescos de las cepas en estudio durante 3, 6 y 10 días consecutivos. El estudio de traslocación a hígado resultó negativo (debido a que el hígado es un órgano estéril, la presencia de colonias en las placas indicaría traslocación de microbiota entérica por desbalance intestinal) lo que indica que no hubo migración de flora entérica a sitios extraintestinales, constituyendo así una confirmación de la seguridad de las cepas en estudio para la dosis administrada.

Los estudios morfológicos en cortes histológicos de intestino delgado tratados con hematoxilina/eosina (Fig. 35) mostraron una arquitectura normal del intestino y ausencia de síntomas de edema, inflamación, excesivo infiltrado linfocitario o daño tisular, lo que constituye otra medida de la seguridad oral de las cepas administradas para el modelo elegido.

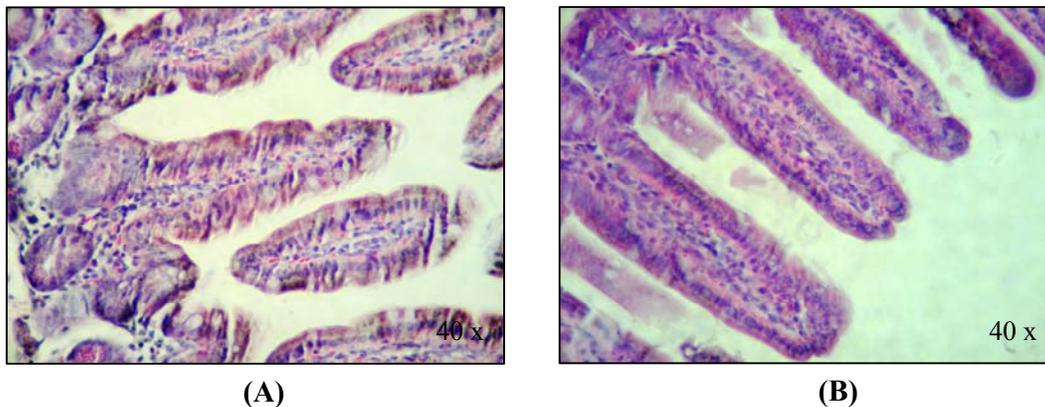


Figura 35. Cortes histológicos de intestino delgado tratados con hematoxilina/eosina. **A:** grupo control. **B:** grupo tratado (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200, 10 días de alimentación).

En relación a la activación de la respuesta inmune se evaluaron dos parámetros: la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales (medida de la respuesta inmune sistémica) y el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino

delgado (medida de la respuesta inmune local). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fagocitosis de macrófagos aislados del grupo control respecto a los grupos tratados (Fig. 36). El estudio por inmunohistoquímica del número de células productoras de IgA (Fig. 37) demostró que ambas cepas fueron capaces de activar la respuesta inmune. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 fue capaz de inducir un aumento significativo del N° de células IgA+ para todos los períodos de alimentación, con una tendencia a aumentar, aunque no significativa, hacia el día 10 de alimentación. Sin embargo, el derivado resistente a bilis fue capaz de inducir el aumento de IgA para los 6 y 10 días de alimentación.

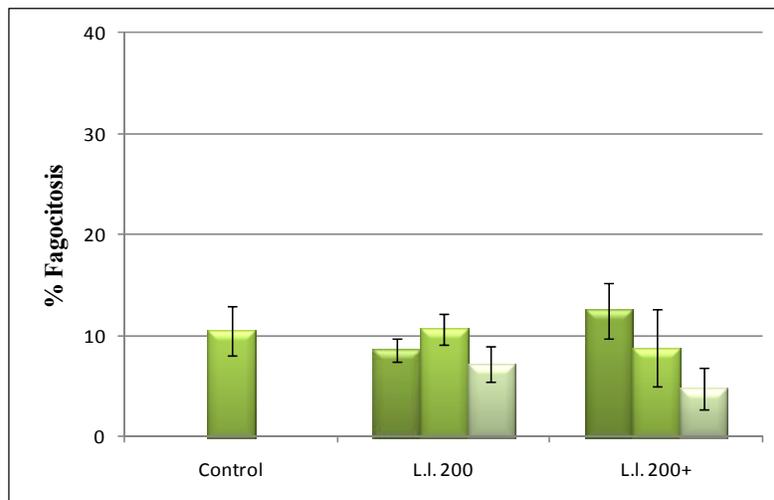


Figura 36. Actividad fagocítica (% Fagocitosis) de macrófagos peritoneales luego de la administración oral de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (L.I. 200) y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (L.I. 200+) durante 3 (■), 6 (■) ó 10 (■) días consecutivos.

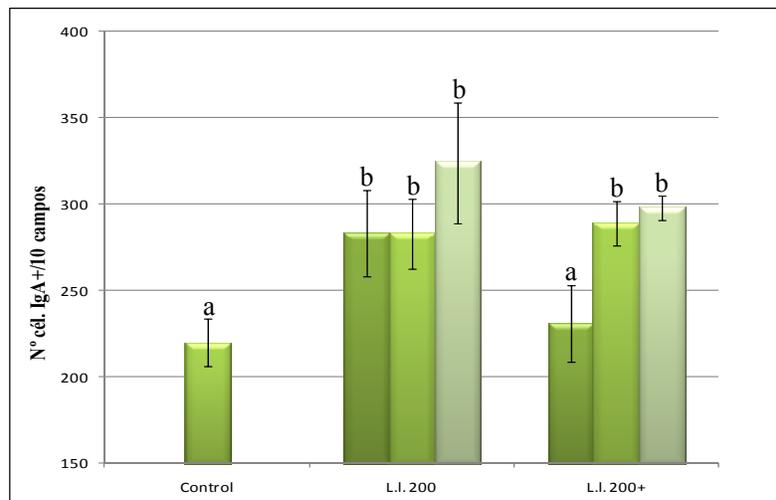


Figura 37. Efecto de la administración oral de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 (L.I. 200) y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ (L.I. 200+) durante 3 (■), 6 (■) ó 10 (■) días consecutivos sobre el número de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado de ratones BALB/c. ^{a, b} Las columnas con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

II.c.5 Discusión

En esta última parte del trabajo se evaluó el efecto de la adaptación a bilis de la cepa de origen no intestinal *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 sobre sus aspectos morfológicos, propiedades superficiales, capacidad de interacción con el intestino y la capacidad de inducir una respuesta inmune. Los estudios de microscopía electrónica de barrido y transmisión revelaron profundos cambios morfológicos a nivel de superficie y membrana celular, los que de alguna forma podrían anticipar los cambios en los parámetros analizados con posterioridad debido a que la mayor parte de los determinantes antigénicos se encuentran en la pared celular del microorganismo (Skurnik y col., 2010). Estos resultados se alinean con los de Taranto y col. (2006) quienes demostraron, por microscopía de transmisión, el despegue de zonas de la pared de la membrana en células de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 expuestas a ácidos biliares. Las cinéticas de crecimiento permitieron corroborar para esta cepa el hecho de que las sales biliares de origen porcino presentan mayor actividad inhibitoria que las de origen bovino (Begley y col., 2005), aunque representarían mejor la composición de las sales biliares humanas. No obstante, la gran mayoría de los estudios científicos de tolerancia a sales biliares se llevan a cabo utilizando las de origen bovino (Oh y col., 2000; Collado y Sanz, 2007; Lee y col., 2008b). *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ fue capaz de crecer en presencia de ciertos ácidos biliares específicos aunque no fue capaz de deconjugarlos, un mecanismo que explica parcialmente la tolerancia a las sales biliares (Begley y col., 2005).

Al momento de aislar y realizar una primera caracterización de los derivados resistentes no se observaron diferencias en la hidrofobicidad celular de las cepas originales respecto a sus derivados resistentes cuando las cepas se desarrollaron en caldo MRS (Cap. IIa). Sin embargo, cuando *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ se desarrolló en presencia de sales biliares se observó una disminución significativa de la hidrofobicidad y de la capacidad de autoagregación, lo cual podría deberse a la acción detergente de las sales biliares sobre los ácidos grasos de membrana (Begley y col., 2005). La hidrofobicidad superficial y la capacidad de autoagregación se han relacionado a la capacidad de adhesión de la cepa (Basson y col., 2007) o a la capacidad de prevenir infecciones entéricas por coagregación con patógenos intestinales (Golowczyc y col., 2007) o por adhesión directa al epitelio impidiendo la adhesión de

patógenos (Gopal y col., 2001). La cepa original, que presentó una alta capacidad de autoagregación, no fue capaz de coagregar con la cepa del patógeno utilizado. Esto podría interpretarse como una característica positiva si se supone que no existiría riesgo de que la coagregación aumente el tiempo de permanencia del patógeno sobre la mucosa intestinal por la capacidad de adhesión de la cepa, estando entonces, la posible prevención de la infección, mediada por mecanismos inmunológicos más que por el impedimento físico de la adhesión del patógeno.

Con el objetivo de investigar si la presencia de bilis afectó algunas propiedades de superficie de las cepas, se complementó el estudio de proteómica con ensayos de adhesión a líneas celulares intestinales en presencia y ausencia de bilis. Los resultados mostraron que la presencia de sales biliares disminuyó la capacidad de adhesión a la línea celular HT29-MTX. Previamente, Gueimonde y col. (2005) informaron que las sales biliares disminuyeron la adhesión de *Bifidobacterium* a mucus intestinal. Es posible que la producción de una o varias adhesinas proteicas en la célula bacteriana resulte disminuida bajo estrés por bilis. Las características superficiales de una célula dependen de varios factores como la presencia de adhesinas, exopolisacáridos e hidrofobicidad, entre otros parámetros. La pérdida de adhesión se observó también *in vivo* en el estudio de la interacción de las cepas con el epitelio intestinal mediante el uso de bacterias marcadas con FITC. Esta menor capacidad de adhesión resultó en una menor persistencia del derivado resistente a bilis en el ámbito intestinal, aunque presentó mayor capacidad de sobrevivida en este ecosistema adverso. Un estudio en humanos donde se administró una cepa de *Lactobacillus crispatus* y un mutante no autoagregante demostró la mayor persistencia en el tracto intestinal de la cepa autoagregante en relación a su mutante (Cesena y col., 2001). Las mismas cepas empleadas en un estudio posterior en ratones demostró una mayor capacidad del fenotipo autoagregante de incrementar la expresión de receptores tipo Toll 2 (Toll-like receptor 2) y de las citoquinas reguladoras IL-10 e IL-6 (Voltan y col., 2007). Finalmente, estudios de proteómica llevados a cabo con estas mismas cepas de *L. crispatus* (Siciliano y col., 2007) señalan la subexpresión de la molécula EF-Tu en el fenotipo mutante, en coincidencia con lo observado en nuestro estudio proteómico luego de la adaptación a bilis, como responsable de la pérdida de capacidad de autoagregación. En cuanto a la capacidad de promover efectos benéficos en el huésped,

se observaron efectos positivos sobre la respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal (aumento del número de células productoras de IgA) pero no en sitios distantes como la cavidad peritoneal, indicando un efecto local de ambas cepas. La capacidad de cepas de *L. delbrueckii* de promover las defensas innatas del intestino mediada por IgA fue reportada previamente (Perdigón y col., 1999; Vinderola y col., 2007). Si bien la adaptación a bilis no modificó la magnitud de la respuesta inmune observada (nivel de células productoras de IgA), sí implicó un “retardo” en la capacidad de inducir esta respuesta. Mientras que la cepa original indujo efectos benéficos a los 3 días de ser administrada, el derivado resistente a bilis indujo la misma magnitud del efecto logrado para un período de 6 días. La mayor capacidad de sobrevivida en el ámbito intestinal podría haber revertido en parte los efectos no deseados de la adaptación a bilis como la pérdida de hidrofobicidad y capacidad de adhesión. Además, la adhesión a las superficies mucosas ha sido señalada como una característica necesaria pero no suficiente para lograr el efecto probiótico (Bibiloni y col., 1999). Más específicamente, un estudio reciente demostró que no hay una relación directa entre adhesión y capacidad inmunomoduladora, debido a los numerosos y complejos mecanismos que le permiten a un microorganismo interactuar con el huésped e inducir sus efectos inmunomoduladores (Kotzamanidis y col., 2010). Esta parte del estudio muestra la importancia del estudio *in vivo* de los logros obtenidos *in vitro* y de los mecanismos de acción ya que, a priori, la ganancia de resistencia a factores de estrés parecería ser un hito sin contraindicaciones en la adaptación de cepas a factores adversos.

II.c.6 Conclusiones

La adaptación a bilis de *Lb. delbruecki* subsp. *lactis* 200, una cepa de origen no intestinal, permitió una mayor sobrevivencia de la misma en condiciones adversas aunque disminuyó su hidrofobicidad en presencia de sales biliares y su capacidad de adhesión *in vitro* e *in vivo*, modificando su capacidad de interacción con el intestino y su cinética de promoción de las defensas innatas del intestino (IgA). Se observó además la importancia de los estudios *in vivo* para ratificar o rectificar los resultados *in vitro*.

Conclusiones generales y comentarios finales

En este trabajo de Tesis Doctoral se abordó la innovación en el campo de los productos lácteos evaluando: 1) el efecto de una tecnología novedosa, la HPH, sobre las propiedades de matrices lácteas (quesos y yogures) y su capacidad de vehicular bacterias probióticas y 2) la adaptación de bacterias lácticas a barreras biológicas como las sales biliares.

– En relación a la innovación en quesos mediante tratamiento HPH de la leche antes de la elaboración, los productos obtenidos presentaron mayor firmeza y menos desuerado. Los cambios en la matriz (mayor contenido de aminoácidos y ácidos grasos libres) podrían haber sido la causa de la mejor viabilidad de la cepa *Lactobacillus acidophilus* H5 en los quesos HPH-Pro. Esta tecnología contribuyó, junto con el agregado de bacterias probióticas, a modificar las características sensoriales del producto. El incremento en la liberación del ácido graso C18:2 podría mejorar las propiedades funcionales de los quesos HPH-Pro.

En relación a la innovación en leches fermentadas, el tratamiento HPH de la leche podría resultar una herramienta útil para diversificar el mercado de las mismas, especialmente en términos de textura. Esta tecnología no modificó, para las cepas evaluadas, la viabilidad de las bacterias probióticas pero favoreció la viabilidad del cultivo starter. Estudios futuros con otras cepas y presiones aplicadas podrán determinar su completo potencial para proteger la viabilidad de cultivos probióticos como se demostró en el caso de los quesos.

– La aplicación de un proceso de adaptación a concentraciones fisiológicas de bilis a lactobacilos no intestinales permitió llevar adelante un estudio básico y aplicado de los cambios experimentados por las cepas. De este proceso resultaron un número de cepas capaces de crecer en presencia de concentraciones fisiológicas de sales biliares, algunas de ellas con resistencia natural o adquirida a condiciones ácidas estomacales.

El estudio en detalle de la adaptación a bilis de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200 permitió detectar los cambios fisiológicos, morfológicos y funcionales experimentados por la cepa ante este factor de estrés. La respuesta celular a bilis mostró adaptaciones tanto a nivel de pared y membrana como en las rutas metabólicas para la utilización de azúcares, sin modificar la síntesis de enzimas capaces de catabolizar las sales biliares individuales. La adaptación y exposición a bilis en *Lb. delbrueckii* subsp.

lactis 200+ disminuyó su hidrofobicidad y capacidad de autoagregación y adhesión, aunque le permitió una mayor sobrevivencia en el TGI, retardando ligeramente su capacidad de inducir una respuesta inmune *in vivo*.

Uno de los principales objetivos de un trabajo doctoral es la formación de recursos humanos y expandir el conocimiento más allá del estado del arte al momento del desarrollo del mismo. En este sentido, el presente trabajo doctoral abordó estas dos premisas, adelantándose en el tiempo con estudios sobre una tecnología novedosa y que aún no se aplica en nuestro país, y por otro lado, permitió recorrer desde el *in vitro* al *in vivo* el camino de la adaptación a bilis de lactobacilos no intestinales, evaluando críticamente las ventajas y desventajas, logros y contratiempos de los procedimientos aplicados y de los resultados obtenidos y sentando las bases de una estrategia que permite mejorar aspectos biológicos en bacterias lácticas.

Bibliografía

- Adolfsson, O.; Meydani, S.N. y Russell, R.M. (2004) *Yogurt and gut function*. Am. J. Clin. Nutr. 80: 245-256.
- Alonso, L.; Cuesta, E.P. y Gilliland. S.E. (2003) *Production of free conjugated linoleic acid by Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei of human origin*. J. Dairy Sci. 86: 1941-1946.
- Andrews, W.H. y Hammack, T.S. (1998) *Salmonella*. En *Bacteriological Analytical Manual Online*, Updated 2006. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html#authors>
- Anglade, P.; Demey, E.; Labas, V.; Le Caer, J.P. y Chich, J.F. (2000) *Towards a proteomic map of Lactococcus lactis NCDO 763*. Electrophoresis. 21: 2546–2549.
- Basson, A.; Flemming, L.A. y Chenia, H.Y. (2007) *Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of Flavobacterium johnsoniae-Like Isolates*. Microb. Ecol. 55(1): 1-14.
- Begley, M.; Gahan, C.G.M. y Hill, C. (2005) *The interaction between bacteria and bile*. FEMS Microbiol. Rev. 29: 625-651.
- Benedetti, S.; Sinelli, N.; Buratti, S. y Riva, M. (2005) *Shelf life of Crescenza cheese as measured by electronic nose*. J. Dairy Sci. 88: 3044–3051.
- Berdagué, J.L.; Jeunet, R. y Grappin, R. (1987) *Ripening and quality of Gruyère de Comté cheese III: Lactic acid fermentation and levels of volatile fatty acids in Comté cheese*. Lait. 67: 249–263.
- Bergamini, C.; Hynes, E.R. y Zalazar, C. (2006) *Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese*. Int. Dairy J. 16: 856-866.
- Bibiloni, R.; Pérez, P.F. y De Antoni, G.L. (1999) *Will a High Adhering Capacity in a Probiotic Strain Guarantee Exclusion of Pathogens from Intestinal Epithelia?* Anaerobe. 5: 519-524.
- Blanchette, L.; Roy, D.; Belanger, G. y Gauthier, S.F. (1996) *Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria*. J. Dairy Sci. 79: 8–15.
- Bottazzi, V. (1993) *Formaggio Crescenza*. En *Microbiologia Lattiero-Casearia*. Edagricole-Edizioni Agricole della Calderini S.R.L, Bologna, Italia, p. 236-239.

- Bouauoina, H.; Desrumaux, A.; Loisel, C. y Legrand, J. (2006) *Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment*. Int. Dairy J. 16: 275-284.
- Boylston, T.D.; Vinderola, C.G.; Ghoddusi, H.B. y Reinheimer, J.A. (2004) *Incorporation of Bifidobacterium into cheeses: challenges and rewards*. Int. Dairy J. 14: 375-387.
- Briñez, W.J.; Roig-Sagués, A.X.; Hernández Herrero, M.M. y López, B.G. (2006) *Inactivation of Listeria innocua in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization*. J. Food Prot. 69: 86-92.
- Bron, P.A.; Grangette, C.; Mercenier, A.; Willem, M.; de Vos, W.M. y Kleerebezem, M. (2004a) *Identification of Lactobacillus plantarum genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice*. J. Bacteriol. 186(17): 5721-5729.
- Bron, P.A.; Marco, M.; Hoffer, S.M.; Van Mullekom, E.; de Vos, W.M. y Kleerebezem, M. (2004b) *Genetic characterization of the bile salt response in Lactobacillus plantarum and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract*. J. Bacteriol. 186: 7829-7835.
- Bron, P.A.; Molenaar, D.; Vos, W.M. y Kleerebezem, M. (2006) *DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 100: 728-738.
- Bunning, V.K.; Crawford, R.G.; Tierney, J.T. y Peeler, J.T. (1990) *Thermotolerance of Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium after sublethal heat shock*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3216-3219.
- Buriti, F.C.A.; da Rocha, J.S. y Saad, S.M.I. (2005). *Incorporation of Lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage*. Int. Dairy J. 15: 1279-1288.
- Capra, M.L.; Patrignani, F.; Quiberoni, A.L.; Reinheimer, J.A.; Lanciotti, R. y Guerzoni, M.E. (2009) *Effect of high pressure homogenization on lactic acid bacteria phages and probiotic bacteria phages*. Int. Dairy J. 19: 336-341.
- Cesena, C.; Morelli, L.; Alander, M.; T. Siljander, T.; Tuomola, E.; Salminen, S.; Mattila-Sandholm, T.; Vilpponen-Salmela, T. y von Wright, A. (2001) *Lactobacillus crispatus and its nonaggregating mutant in human colonization trials*. J. Dairy Sci. 84: 1001-1010.

- Champagne, C.P.; Gardner, N.J. y Roy, D. (2005). *Challenges in the addition of probiotic cultures to foods*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45: 61-84.
- Ciron, C.I.E.; Gee, V.L.; Kelly, A.L. y Auty, M.A.E. (2010) *Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts*. Int. Dairy J. 20: 314-320.
- Collado, M.C. y Sanz, Y. (2006) *Method for direct selection of potentially probiotic Bifidobacterium strains from human feces based on their acid-adaptation ability*. J. Microbiol. Methods. 66: 560-563.
- Collado, M.C. y Sanz, Y. (2007) *Induction of acid resistance in Bifidobacterium: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains*. J. Appl. Microbiol. 103: 1147–1157.
- Corbo, M.R.; Albenzio, M.; DeAngelis, M.; Sevi, A. y Gobbetti, M. (2001) *Microbiological and biochemical properties of canestrato pugliese hard cheese supplemented with Bifidobacteria*. J. Dairy Sci. 84: 551–561.
- Cruz, N.S.; Capellas, M.; Jaramillo, D.P.; Trujillo, A.J.; Guamis, B. y Ferragut, V. (2009) *Soy milk treated by ultra high-pressure homogenization: Acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product*. Food Hydrocolloids. 23: 490-496.
- Datta, N. y Deeth, H.C. (1999) *High pressure processing of milk and dairy products*. Aust. J. Dairy Technol. 54: 41-48.
- Datta, N.; Hayes, M.G.; Deeth, H.C. y Kelly, A.L. (2005) *Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk*. J. Dairy Res. 72: 1-7.
- Dave, R.I. y Shah, N.P. (1998) *Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt*. J. Dairy Sci. 81: 2804-2816.
- De Ancos, B.; Cano, M.P. y Gomez, R. (2000) *Characteristics of stirred low-fat yogurt as affected by high pressure*. Int. Dairy J. 10: 105-111.
- de Jong, C. y Badings, H.T. (1990) *Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis*. J. High Resolut. Chromatogr. 13: 94–98.
- De los Reyes-Gavilán, C.G.; Ruas-Madiedo, P.; Noriega, L.; Cuevas, I.; Sánchez, B. y Margolles, A. (2005) *Effect of acquired resistance of bile salts on enzymatic*

- activities involved in the utilisation of carbohydrates by bifidobacteria. An overview.* Lait. 85: 113-123.
- de Moreno de Leblanc, A. y Perdigón, G. (2004) *Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer.* Med. Sci. Monit. 10(4): BR96-104.
- Dinakar, P. y Mistry, V.V. (1994) *Growth and viability of Bifidobacterium bifidum in Cheddar Cheese.* J. Dairy Sci. 77: 2854-2864.
- Dogi, C.A. y Perdigón, G. (2006) *Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria.* J. Dairy Res. 73: 357-366.
- Duncan, S.E. (1998) *Dairy products: the next generation. Altering the image of dairy products through technology.* J. Dairy Sci. 81: 877-883.
- Elli, M.; Callegari, M.L.; Ferrari, S.; Bessi, E.; Cattivelli, D.; Soldi, S.; Morelli, L.; Goupil Feuillerat, N. y Antoine, J.M. (2006) *Survival of yogurt bacteria in the human gut.* Appl. Environ. Microbiol. 72: 5113-5117.
- Endo, Y.S.; Kamisada, S.; Fujimoto, K. y Saito, T. (2006) *Trans fatty acids promote the growth of some Lactobacillus strains.* J. Gen. Appl. Microbiol. 52: 29-35.
- Faber, E.J.; Zoon, P.; Kamerling, J.P. y Vliegenthart, J.F.G. (1998) *The exopolysaccharides produced by Streptococcus thermophilus Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures.* Carbohydr. Res. 310: 269-276.
- FAO/WHO (2002) *Guidelines for the evaluation of probiotics in food.* Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm 2002.
- Fasoli, S.; Marzotto, M.; Rizzotti, L.; Rossi, F.; Dellaglio, F. y Torriani, S. (2003) *Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis.* Int. J. Food Microbiol. 8: 59-70.
- Fernández, M.F.; Boris, S. y Barbés, C. (2003) *Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract.* J. Appl. Microbiol. 94: 449-455.

- Ferragut, V.; Cruz, N.S.; Trujillo, A.; Guamis, B. y Capellas, M. (2009) *Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk*. J. Food Eng. 92: 63-69.
- Foley, S.; Lucchini, S.; Zwahlen, M.C. y Brüssow, H. (1998) *A short noncoding viral DNA element showing characteristics of a replication origin confers bacteriophage resistance to Streptococcus thermophilus*. Virology. 250: 377-387.
- Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. y Lynch, C.M. (1998) *Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese*. Aust. J. Dairy Technol. 53, 83-89.
- Frees, D. y Ingmer, H. (1999) *ClpP participates in the degradation of misfolded protein in Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. 31: 79-87.
- Fujisawa, T. y Mori, M. (1996) *Influence of bile salts on β -glucuronidase activity of intestinal bacteria*. Lett. Appl. Microbiol. 22: 271-274.
- Fuller, R. (1991) *Probiotics in human medicine*. Gut 32:439-442.
- Gallardo-Escamilla, F.J.; Kelly, A.L. y Delahunty, C.M. (2007) *Mouthfeel and flavor of fermented whey with added hydrocolloids*. Int. Dairy J. 17: 308-315.
- Ganesan, B. y Weimer, B.C. (2004) *Role of aminotransferase *IlvE* in production of branched-chain fatty acids by Lactococcus lactis subsp. lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 638-664.
- Gardiner, G.; Stanton, C.; Lynch, P.B.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (1999) *Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract*. J. Dairy Sci. 82: 1379-1387.
- Gardini, F.; Lanciotti, R.; Guerzoni, M.E. y Torriani, S. (1999) *Evaluation of aroma production and survival of Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Lactobacillus acidophilus in fermented milks*. Int. Dairy J. 9: 125-134.
- Geciova J.; Bury, D. y Paul J. (2002) *Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry-a review*. Int. Dairy J. 12: 541-553.
- Giard, J.C.; Laplace, J.M.; Rincé, A.; Pichereau, V.; Benachour, A.; Leboeuf, C.; Flahaut, S.; Auffray, Y. y Hartke, A. (2001) *The stress proteome of Enterococcus faecalis*. Electrophoresis. 22: 2947-2954.

- Gill, H.S. y Rutherford, K.J. (2001) *Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium Lactobacillus rhamnosus in mice*. Br. J. Nutr. 86: 285-289.
- Gilliland, S.E. y Speck, M.L. (1977) *Instability of Lactobacillus acidophilus in yogurt*. J. Dairy Sci. 60: 1394-1398.
- Gilliland, S.E. (1998) *Fermented milks and probiotics*. En: *Applied Dairy Microbiology* (Eds.: Marth, E.H. y Steel, J.L). Marcel Dekker Inc, New York, USA, p. 195-212.
- Giraffa, G.; De Vecchi, P. y Rossetti, L. (1998) *Identification of Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus and subspecies lactis dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis*. J. Appl. Microbiol. 85: 918-924.
- Giraffa, G.; Andrighetto, G.; Antonello, C.; Gatti, M.; Lazzi, M.; Marcazzan, G.; Lombardi, A. y Neviani, E. (2004) *Genotypic and phenotypic diversity of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis strains of dairy origin*. Int. J. Food Microbiol. 91: 129-139.
- Gobbetti, M.; Corsetti, A.; Smacchi, E.; Zocchetti, A. y De Angelis, M. (1998) *Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria*. J. Dairy Sci. 81: 37-47.
- Gobbetti, M.; Lanciotti, R.; De Angelis, M.; Corbo, M.R.; Massini, R. y Fox, P.F. (1999a) *Study of the effects of temperature, pH and NaCl on the peptidase activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology*. Int. Dairy J. 9: 865-875.
- Gobbetti, M.; Lanciotti, R.; De Angelis, M.; Corbo, M.R.; Massini, R. y Fox, P.F. (1999b) *Mathematical modelling of the effects of temperature, pH, NaCl and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria*. Enzyme Microb. Technol. 25: 795-809.
- Goldin, B.R. (1998) *Health benefits of probiotics*. Br. J. Nutr. 80(4): S203-7.
- Golowczyc, M.A.; Mobili, P.; Garrote, G.L.; Abraham, A.G. y De Antoni, G.L. (2007) *Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer protein against Salmonella enterica serovar Enteritidis*. Int. J. Food Microbiol. 118: 264-273.
- Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X.; Klaver, F.A.M. y Grande, H.J. (1995) *Incorporation and survival of Bifidobacterium sp. strain Bo and Lactobacillus acidophilus strain Ki in a cheese product*. Neth. Milk Dairy J. 49: 71-95.

- Gómez-Zavaglia, A.; Kociubinski, G.; Pérez, P.; Disalvo, E. y de Antoni, G. (2002) *Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria*. J. Appl. Microbiol. 93: 794-799.
- Gopal, P.K.; Prasad, J.; Smart, J. y Gill, H.S. (2001) *In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 67: 207–216.
- Görg, A.; Boguth, G.; Obermaier, C. y Weiss, W. (1998) *Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient*. Electrophoresis. 19: 1516-1519.
- Gouesbet, G.; Jan, G. y Boyaval, P. (2002) *Two-dimensional electrophoresis study of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus thermotolerance*. Appl. Environ. Microbiol. 68(3): 1055-1063.
- Grangette, C.; Muller-Alouf, H.; Hols, P.; Goudercourt, D.; Delcour, J.; Turner, M. y Mercenier, A. (2004) *Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of Lactic Acid Bacteria*. Infect. Immun. 72: 2731-2737.
- Guarner, F.; Perdigon, G.; Corthier, G.; Salminen, S.; Koletzko, B. y Morelli, L. (2005) *Should yoghurt cultures be considered probiotic?* Br. J. Nutri. 93: 783–786.
- Gueimonde, M.; Noriega, L.; Margolles, A.; de los Reyes-Gavilán, C. y Salminen, S. (2005) *Ability of Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus*. Int. J. Food Microbiol. 101: 341-346.
- Gueimonde, M.; Kalliomäki, M.; Isolauri, E. y Salminen S. (2006a) *Probiotic intervention in neonates--will permanent colonization ensue?* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 42(5): 604-606.
- Gueimonde, M.; Jaloe, L.; He, F.; Hiramatsu, M. y Salminen, S. (2006b) *Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli*. Food Res. Int. 39: 467–471.
- Gueimonde, M; Margolles, A; de los Reyes-Gavilán, C y Salminen, S. (2007) *Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile - A preliminary study*. Int. J. Food Microbiol. 113: 228-232.

- Guerzoni, M.E.; Ferruzzi, M.; Gardini, F. y Lanciotti, R. (1999a) *Combined effects of ethanol, high homogenization pressure, and temperature on cell fatty acid composition in Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. 45: 805-810.
- Guerzoni, M.E.; Vannini, L.; Chaves-López, C.; Lanciotti, R.; Suzzi, G. y Gianotti, A. (1999b) *Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses*. J. Dairy Sci. 82: 851-862.
- Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R. y Cocconcelli, P.S. (2001) *Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in Lactobacillus helveticus*. Microbiology. 147: 2255-2264.
- Guerzoni, M.E.; Vannini, L.; Lanciotti, R. y Gardini, F. (2002) *Optimisation of the formulation and of the technological process of egg-based products for the prevention of Salmonella enteritidis survival and growth*. Int. J. Food Microbiol. 73: 367-374.
- Guglielmotti, D.M.; Briggiler Marcó, M.; Golowczyc, M.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2007). *Probiotic potential of Lactobacillus delbrueckii strains and their phage resistant mutants*. Int. Dairy J. 17: 916-925.
- Haller, D.; Colbus, H.; Ganzle, M.G.; Scherenbacher, P.; Bode, C. y Hammes, W.P. (2001) *Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin*. Syst. Appl. Microbiol. 24: 218-226.
- Hassan, A.N.; Frank, J.F.; Schmidt, K.A. y Shalabi, S.I. (1996) *Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures*. J. Dairy Sci. 79: 2098–2103.
- Hayes, M.G. y Kelly, A.L. (2003a) *High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties*. J. Dairy Res. 70: 297-305.
- Hayes, M.G. y Kelly, A.L. (2003b) *High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity*. J. Dairy Res. 70: 307-313.
- Hayes, M.G., Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2005) *Potencial applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk*. J. Dairy Res. 72: 25-33.
- Hebert, E.M.; Mamone, G.; Picariello, G.; Raya, R.R.; Savoy, G.; Ferranti, P. y Addeo, F. (2008) *Characterization of the pattern of alpha(s1)-and beta-casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from*

- Lactobacillus delbrueckii *subsp.* lactis CRL 581. Appl. Environ. Microbiol. 74: 3682-3689.
- Heller, K.J.; Bockelmann, W.; Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. (2003) *Cheese and its potential as a probiotic food*. En *Handbook of Fermented Functional Foods*. (Ed.: Farnworth, E.R.) CRC Press, Boca Raton, USA, p. 203–225.
- Heuman, D.M.; Bajaj, R.S. y Lin, Q. (1996) *Adsorption of mixtures of bile salts taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salts toxicity and cytoprotection*. J. Lipid Res. 37: 562-573.
- Hopkins, M.J y Macfarlane, G.T. (2002) *Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection*. J. Med. Microbiol. 51: 448-454.
- Horváth, I.; Multhoff, G.; Sonnleitner, A. y Vígh, L. (2008) *Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones*. Biochim. Biophys. Acta 1778: 1653-1664.
- Hung, D.T.; Zhu, J.; Sturtevant, D. y Mekalanos, J.J. (2006) *Bile acids stimulate biofilm formation in Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 59: 193-201.
- Huppertz, T.; Kelly, A.L. y Fox, P. (2002) *Effects of high pressure on constituents and properties of milk*. Int. Dairy J. 12, 561-572.
- International Dairy Federation. (1964) *Determination of the protein content of processed cheese products*. IDF Standard 25. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- International Dairy Federation. (1970) *Determination of Dry Matter Content in Whey Cheese*. IDF Stand. 58. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- International Dairy Federation. (1986) *Cheese and processed cheese products. Determination of fat content*. IDF Standard 5B. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- International Dairy Federation. (1993) *Milk – Determination of nitrogen content*. IDF Standard 20B. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- ISO. (1988) *Sensory analysis. Standard 8589: General guidance for the design of test rooms*. Int. Org. Standard. Paris, France.
- Izco, J.M.; Irigoyen, A.; Torre, P y Barcina, Y. (2000) *Effect of the activity levels of the added proteolytic enzyme mixture on free amino acids in ripening Ossau-Iraty cheese*. J. Chromatogr. 881: 69-79.

- Kalavrouzioti, I.; Hatzikamari, M.; Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. (2005) *Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts*. Int. J. Dairy Technol. 58: 30-38.
- Kasimoglu, A.; Göncüoğlu, M. y Akgün, S. (2004) *Probiotic white cheese with Lactobacillus acidophilus*. Int. Dairy J. 14: 1067-1073.
- Kheadr, E.E.; Vachon, J.F.; Paquin, P. y Fliss, I. (2002) *Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese*. Int. Dairy J. 12: 435-446.
- Kleinig, A.R. y Middelberg, A.P.J. (1998) *On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenization*. Chem. Eng. Sci. 53(5): 891-898.
- Kociubinsky, G.; Pérez, P. y de Antoni, G. (1999) *Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria*. J. Food Prot. 62: 905-912.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006) *Bioactive peptides: production and functionality*. Int. Dairy J. 16: 945-960.
- Kotzamanidis, C.; Kourelis, A.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Tzanetakis, N. y Yiangou, M. (2010) *Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic Lactobacillus strains*. Int. J. Food Microbiol. 140: 154-163.
- Kuchroo, C.N. y Fox, P.F. (1982) *Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures*. Milchwissenschaft. 37: 331-335.
- Laan, H.; Tan, S.E.; Bruinenberg, P.; Limsowtin, G. y Broome, M. (1998) *Aminopeptidase activities of starter and non-starter lactic acid bacteria under simulated Cheddar cheese ripening conditions*. Int. Dairy J. 8: 267-274.
- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during de assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227: 680-685.
- Lanciotti, R.; Gardini, F.; Sinigaglia, M. y Guerzoni, M.E. (1996) *Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization*. Lett. Appl. Microbiol. 22: 165-168.
- Lanciotti, R.; Chaves Lopez, C.; Patrignani, F.; Paparella, A.; Guerzoni, M.E.; Serio, A. y Suzzi, G. (2004a). *Effects of milk treatment with HPH on microbial population as well as on the lipolytic and proteolytic profiles of Crescenza cheese*. Int. J. Dairy Technol. 57: 19-25.

- Lanciotti, R.; Vannini, L.; Pittia, P. y Guerzoni, M.E. (2004b) *Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yogurt*. Food Microbiol. 21: 753–760.
- Lanciotti, R.; Vannini, L.; Patrignani, F.; Iucci, L.; Vallicelli, M.; Ndagijimana, M. y Guerzoni, M.E. (2006) *Effect of high pressure homogenization of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese*. J. Dairy Res. 73: 216–226.
- Lanciotti, R.; Patrignani, F.; Iucci, L.; Guerzoni, M.E.; Suzzi, G.; Belletti, N. y Gardini, F. (2007a) *Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses*. Food Chem. 104: 693-701.
- Lanciotti, R.; Patrignani, F.; Iucci, L.; Saracino, P. y Guerzoni, M.E. (2007b) *Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some Lactobacillus species*. Food Chem. 102: 542–550.
- Lee, Y.K.; Nomoto, K.; Salminen, S. y Gorbach, S.L. (1999) *Handbook of probiotics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Lee, K.; Lee, H.G. y Choi, Y.J. (2008a) *Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium Lactobacillus reuteri*. J. Biotechnol. 137: 14–19.
- Lee, N.; Yun, C.; Kim, S.W.; Chang, H.; Kang, C.W. y Paik, H.D. (2008b) *Screening of Lactobacilli derived from chicken feces and partial characterization of Lactobacillus acidophilus A12 as animal probiotics*. J. Microbiol. Biotechnol. 18(2): 338-342.
- Len, M.C.L.; Harty, D.W.S. y Jacques, N.A. (2004a) *Proteome analysis of Streptococcus mutans metabolic phenotype during acid tolerance*. Microbiology-SGM. 150: 1353-1366.
- Len, A.C.L.; Harty, D.W.S. y Jacques, N.A. (2004b) *Stress-responsive proteins are upregulated in Streptococcus mutans during acid tolerance*. Microbiology-SGM. 150: 1339-1351.
- Lesuffleur, T.; Porchet, N.; Aubert, J.P.; Swallow, D.; Gum, J.R.; Kim, Y.S.; Real, F.X. y Zweibaum, A. (1993). *Differential expression of the human mucin genes MUC1*

- to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. J. Cell Sci. 106: 771-783.*
- Leverrier, P.; Dimova, D.; Pichereau, V.; Auffray, Y.; Boyaval, P. y Jan, G. (2003) *Susceptibility and adaptative response to bile salts in Propionibacterium freudenreichii: physiological and proteomic analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3809-3818.*
- Lick, S.; Drescher, K. y Heller, K.J. (2001) *Survival of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in the terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4137-4143.*
- Lim, E.M.; Ehrlich, S.D. y Maguin, E. (2000) *Identification of stress-inducible proteins in Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus. Electrophoresis. 21: 2557-2561.*
- Lopez-Fandiño, R.; De la Fuente, M.G.; Ramos, M. y Olano, A. (1998) *Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurised milks from different species. J. Dairy Res. 65: 69-78.*
- Lucey, J.A. y Singh, H. (1997) *Formation and physical properties of acid milk gels: a review. Food Res. Int. 30: 529-542.*
- Lucey, J.A. (2004) *Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. Int. J. Dairy Technol. 57: 77-84.*
- Madadlou, A.; Khosrowshahi, A.; Mousavi, M.E. y Emamdjome, Z. (2006) *Microstructure and rheological properties of Iranian White cheese coagulated at various temperatures. J. Dairy Sci. 89: 2359-2364.*
- Mainville, I.; Arcand, Y. y Farnworth, E.R. (2005) *A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. Int. J. Food Microbiol. 99: 287-296.*
- Maldonado-Galdeano, C. y Perdigón, G. (2004) *Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. J. Appl. Microbiol. 97: 673-681.*
- Marceau, A.; Zagorec, M.; Chaillou, S.; Méra, T. y Champomier-Vergès M.C. (2004) *Evidence for the involvement of at least six proteins in Lactobacillus sakei adaptation to cold temperatures and addition of NaCl. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7260-7268.*

- Margolles, A.; García, L.; Sánchez, B.; Gueimonde, M. y de los Reyes-Gavilán, C. (2003) *Characterisation of a Bifidobacterium strain with acquired resistance to cholate—A preliminary study*. Int. J. Food Microbiol. 82: 191-198.
- Margolles, A.; Mayo, B. y Ruas-Madiedo, P. (2009) *Screening, Identification, and characterization of Lactobacillus and Bifidobacterium strains*. En *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. (Eds.: Lee, Y.K. y Salminen, S.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, p. 4-24.
- Marteau, P.; Minekus, M.; Havennar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1997) *Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile*. J. Dairy Sci. 80: 1031-1037.
- Mater, D.D.G.; Bretigny, L.; Firmesse, O.; Flores, M.J.; Mogenet, A.; Bresson, J.L. y Corthier, G. (2005) *Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt*. FEMS Microbiol. Lett. 250: 185–187.
- McClain, D. y Lee, W.H. (1988) *Development of USDA-FSIS method for isolation of Listeria monocytogenes from raw meat and poultry*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 660–664.
- Menéndez, S.; Centeno, J.A.; Godínez, R. y Rodríguez-Otero, J.L. (2000) *Effect of Lactobacillus strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzuá-Ulloa cheese*. Int. J. Food Microbiol. 59: 37–46.
- Meydani, S.N. y Ha, W.K. (2000) *Immunologic effects of yogurt*. Am. J. Clin. Nutr. 71(4): 861-72.
- Mistry, V.V. y Hassan, H.N. (1992) *Manufacture of nonfat yogurt from a high milk protein powder*. J. Dairy Sci. 75: 907-913.
- Miteva, V.; Boudakov, I.; Ivanova-Stoyancheva, G.; Marinova, B.; Mitev, V. y Mengaud, J. (2001) *Differentiation of Lactobacillus delbrueckii subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. J. Appl. Microbiol. 90: 909-918.
- Montalto, M.; D'Onofrio, F.; Gallo, A.; Cazzato, A. y Gasbarrini, G. (2009) *Intestinal microbiota and its functions*. Dig. Liver Dis. 3: 30-34.

- Moroni, O.; Jean, J.; Autret, J. y Fliss, I. (2002) *Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure*. Int. Dairy J. 12: 907–913.
- Naidu, A.S.; Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. (1999) *Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB)*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38: 13-126.
- Neviani, E. y Giraffa, G. (1993) *Formaggi freschi e molli e loro differenziazione: le microflora lattiche*. Il Latte. 7: 776–780.
- Nighswonger, B.D.; Brashears, M.M. y Gilliland, S.E. (1996) *Viability of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in fermented milk products during refrigerated storage*. J. Dairy Sci. 79: 212-219.
- Noriega, L.; Gueimonde, M.; Sánchez, B.; Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C. (2004) *Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in Bifidobacterium*. Int. J. Food Microbiol. 94: 79-86.
- O’Driscoll, B.; Gahan, C.G.M. and Hill. C. (1996) *Adaptive acid tolerance response in Listeria monocytogenes: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1693-1698.
- Oberman, H. y Libudzisz, Z. (1998) *Fermented milks*. En: *Microbiology of Fermented Foods*. London: Blackie Academic and Professional, p. 309-350.
- Ogawa, J.; Kishino, K.S.; Ando, A.; Sugimoto, S.; Mihara, K. y Shimizu, S. (2005) *Production of conjugated fatty acids by acid lactic bacteria*. J. Biosci. Bioeng. 100: 355-364.
- Oh, S.; Kim, H. y Worobo R.W. (2000) *Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, Lactobacillus acidophilus 30SC*. J. Dairy Sci. 83: 2747–2752.
- Ohashi, Y.; Umesakib, Y. y Ushida, K. (2004) *Transition of the probiotic bacteria, Lactobacillus casei strain Shirota, in the gastrointestinal tract of a pig*. Int. J. Food Microbiol. 96: 61-66.
- Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N.P. (2006) *Development of probiotic Cheddar cheese containing Lactobacillus acidophilus, Lb. casei, Lb. paracasei and Bifidobacterium spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid*. Int. Dairy J. 16: 446–456.

- Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N.P. (2007) *Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with Lactobacillus acidophilus, Lb. casei, Lb. paracasei or Bifidobacterium sp.* Int. Dairy J. 17: 937–945.
- Oozeer, R.; Mater, D.D.G.; Goupil-Feuillerat, N. y G. Corthier, G. (2004) *Initiation of protein synthesis by a labeled derivative of the Lactobacillus casei DN-114 001 strain during transit from the stomach to the cecum in mice harboring human microbiota.* Appl. Environ. Microbiol. 70(12): 6992-6997.
- Organización Mundial de Gastroenterología (2008) *Probióticos y Prebióticos. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE)* http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf.
- Ott, A.; Fay, L.B. y Chaintreau, A. (1997) *Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor.* J. Agric. Food Chem. 45: 850-858.
- Ott, A.; Hugi, A.; Baumgartner, M. y Chaintreau, A. (2000) *Sensory investigation of yogurt flavor perception: Mutual influence of volatiles and acidity.* J. Agric. Food Chem. 48: 441-450.
- Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J. (1998) *The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria.* Int. Dairy J. 8: 749–758.
- Paquin, P. (1999) *Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides.* Int. Dairy J. 9: 329-335.
- Park, H.K.; So, J.S. and Heo, T.R. (1995) *Acid adaptation promotes survival of Bifidobacterium breve against environmental stress.* Food Biotechnol. 4: 226-230.
- Partanen, L.; Marttinen, N. y Alatossava, T. (2001) *Fats and fatty acids as growth factors for Lactobacillus delbrueckii.* Syst. Appl. Microbiol. 24: 500-506.
- Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Maina Mathara, J.; Guerzoni, M.E. y Holzapfel, W.H. (2006) *Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks.* Int. J. Food Microbiol. 107: 1-11.
- Patrignani, F.; Iucci, L.; Lanciotti, R.; Vallicelli, M.; Maina Mathara, J.; Holzapfel, W.H. y Guerzoni, M.E. (2007) *Effect of high pressure homogenization, not fat milk solids and milkfat on the technological performances of a functional strain for the production of probiotic fermented milks.* J. Dairy Sci. 90: 4513-4523.

- Penna, A.L.B.; Gurram, S. y Barbosa-Canovas, G.V. (2006) *Effect of high hydrostatic pressure processing on rheological and textural properties of probiotic low-fat yogurt fermented by different starter cultures*. J. Food Proc. Eng. 29: 447-461.
- Penna, A.L.B.; Gurram, S. y Barbosa-Canovas, G.V. (2007a). *High hydrostatic pressure processing on microstructure of probiotic low-fat yogurt*. Food Res. Int. 40: 510–519.
- Penna, A.L.B.; Gurram, S. y Barbosa-Canovas, G.V. (2007b) *Effect of milk treatment on acidification, physicochemical characteristics, and probiotic cell counts in low fat yogurt*. Milchwissenschaft-Milk Sci. Int. 62, 48-52.
- Perdigón, G.; de Macias, M.E.; Alvarez, S.; Oliver, G. y de Ruiz Holgado, A.P. (1986) *Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice*. Infect. Immun. 53(2): 404-410.
- Perdigón, G.; de Macias, M.E.; Alvarez, S.; Oliver, G. y de Ruiz Holgado, A.P. (1988) *Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus*. Immunology. 63(1): 17-23.
- Perdigón, G.; Vintiñi, E.; Alvarez, S.; Medina, M. y Medici, M. (1999) *Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by Lactic Acid Bacteria*. J. Dairy. Sci. 82(6): 1108-1114.
- Perdigón, G.; Medina, M.; Vintini, E. y Valdez, J.C. (2000) *Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation*. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 13: 141-150.
- Perdigón, G.; Fuller, R. y Raya, R. (2001) *Lactic acid bacteria and their effect on the immune system*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2(1): 27-42.
- Pereda, J.; Ferragut, V.; Quevedo, J.M.; Guamis, B. y Trujillo, A.J. (2007) *Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk*. J. Dairy Sci. 90: 1081-1093.
- Pfeiler, E.A.; Azcarate-Peril, M.A. y Klaenhammer, T.R. (2007) *Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in Lactobacillus acidophilus*. J. Bacteriol. 189: 4192-4198.
- Quevedo, J.M.; Buffa, M.; Guamis, B. y Trujillo, A. (2008) *Effect of ultra-high pressure homogenization of Goats' milk on textural, microstructural and colour*

- characteristics during cheese ripening*. 5th IDF Symposium on Cheese ripening, Bern, Switzerland.
- Rawson, H.L. y Marshall, V.M. (1997) *Effect of 'ropy' strains of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus on rheology of stirred yogurt*. Int. J. Food Sci. Technol. 32: 213-220.
- Rodtong, S. y Tannock, G.W. (1993) *Differentiation of Lactobacillus strains by ribotyping*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3480-3484.
- Rosenberg, M.; Gutnick, D. y Rosenberg, E. (1980) *Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity*. FEMS Microbiol. Lett. 9: 29-33.
- Ross, R.P.; Fitzgerald, G.; Collins, K. y Stanton, C. (2002) *Cheese delivering biocultures - probiotic cheese*. Austr. J. Dairy Technol. 57: 7178-2002.
- Ross, A.I.V.; Griffiths, M.W.; Mittal, G.S. y Deeth, H.C. (2003) *Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms*. Int. J. Food Microbiol. 89: 125-138.
- Ross, R.P.; Desmond, C.; Fitzgerald, G. y Stanton, C. (2005) *Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods*. J. Appl. Microbiol. 98: 1410-1417.
- Ruas-Madiedo, P.; Hernández-Barranco, A.; Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C. (2005) *A bile salt-resistant derivative of Bifidobacterium animalis has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 6564-6570.
- Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; Arigoni, F.; de los Reyes-Gavilán, C.G. y Margolles, A. (2009) *Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by Bifidobacterium animalis*. Appl. Environ. Microbiol. 75: 1204-1207.
- Ruiz, L.; Sánchez, B.; Ruas-Madiedo, P.; de los Reyes-Gavilán, C.G. y Margolles, A. (2007) *Cell envelope changes in Bifidobacterium animalis ssp. lactis as a response to bile*. FEMS Microbiol. Lett. 274: 316-322.
- Ryan, K.A.; Jayaraman, T.; Daly, P.; Canchaya, C.; Curran, S.; Fang, F.; Quigley, E.M. y O'Toole, P.W. (2008) *Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach*. Lett. Appl. Microbiol. 47: 269-274.

- Sainte-Marie, G. (1962) *A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence*. J. Histochem. Cytochem. 10: 250–256.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez, B.; Noriega, L.; Ruas-Madiedo, P.; de los Reyes-Gavilán, C. y Margolles, A. (2004) *Acquired resistance to bile increases fructose-6-phosphate phosphoketolase activity in Bifidobacterium*. FEMS Microbiol. Lett. 235: 35-41.
- Sánchez, B.; Champomier-Vergès, M.C.; Anglade, P.; Baraige, F.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A. y Zagorec, M. (2005) *Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of Bifidobacterium longum NCIMB 8809*. J. Bacteriol. 187: 5799–5808.
- Sánchez, B.; Champomier-Vergés, M.C.; Stuer-Lauridsen, B.; Ruas-Madiedo, P.; Anglade, P. Baraige, F.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Johansen, E.; Zagorec, M. y Margolles, A. (2007a) *Adaptation and response of Bifidobacterium animalis subsp. lactis to bile: a proteomic and physiological approach*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6757-6767.
- Sánchez, B.; Champomier-Vergés, M.C.; Collado, M.C.; Anglade, P.; Garaige, F.; Sanz, Y.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A. y Zagorec, M. (2007b) *Low-pH adaptation and the acid tolerance response of Bifidobacterium longum biotype longum*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6450-6459.
- Sánchez, B.; Ruíz, L.; de los Reyes-Gavilán, C.G. y Margolles, A. (2008) *Proteomics of stress response in Bifidobacterium*. Front. Biosci. 13: 6905-6919.
- Sanders, M.E. y Huis in't Veld, J.H. (1999) *Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues*. Antonine van Leeuwenhoek. 76: 293-315.
- Sandra, S. y Dagleish, D.G. (2005) *Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder*. Int. Dairy J. 15: 1095–1104.
- Sandra, S. y Dagleish, D.G. (2007) *The effect of ultra-high pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk*. Int. Dairy J. 17: 1043-1052.

- Serra, M.; Trujillo, A.J.; Quevedo, J.M.; Guamis, B. y Ferragut, V. (2007) *Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenization*. Int. Dairy J. 17: 782-790.
- Serra, M.; Trujillo, A.J.; Pereda, B.; Guamis, B. y Ferragut, V. (2008) *Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization*. J. Food Eng. 89: 99-104.
- Serra, M.; Trujillo, A.J.; Guamis, B. y Ferragut, V. (2009a) *Proteolysis of yogurts made from ultra-high-pressure homogenized milk during cold storage*. J. Dairy Sci. 92: 71-78.
- Serra, M.; Trujillo, A.J.; Guamis, B. y Ferragut, V. (2009b) *Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk*. Food Hydrocolloids. 23: 82-91.
- Shihata, A. y Shah, N.P. (2002) *Influence of addition of proteolytic strains of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria*. Int. Dairy J. 12: 765-772.
- Siciliani, R.; Cacace, G.; Mazzeo, M.F.; Morelli, L.; Elli, M.; Rossi, M. y Malorni, A. (2007) *Proteomic investigation of the aggregation phenomenon in Lactobacillus crispatus*. Biochim. Biophys. Acta. 1784(2): 335-342.
- Silva, J.; Carvalho, A.S.; Ferreira, R.; Vitorino, R.; Amado, F.; Domingues, P.; Texeira, P. y Gibbs, P.A. (2005) *Effect of the pH of growth on the survival of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus to stress conditions during spray-drying*. J. Appl. Microbiol. 98: 775-782.
- Skurnik, D.; Merighi, M.; Grout, M.; Gadjeva, M.; Maira-Litran, T.; Ericsson, M.; Goldmann, D.A.; Huang, S.S.; Datta, R.; Lee, J.C. y Pier, G.B. (2010) *Animal and human antibodies to distinct Staphylococcus aureus antigens mutually neutralize opsonic killing and protection in mice*. J. Clin. Invest. 120(9): 3220-3233.
- Smiddy, M.A.; Martin, J.E.; Huppertz, T. y Kelly, A.L. (2007) *Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk*. Int. Dairy J. 17: 29-32.
- Songisepp, E.; Kullisaar, T.; Hütt, P.; Elias, P.; Brilene, T.; Zilmer, M. y Mikelsaar, M. (2004) *A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity*. J. Dairy Sci. 87: 2017-2023.

- Streit, F.; Delettre, J.; Corrieu, G. y Béal, C. (2008) *Acid adaptation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance*. J. Appl. Microbiol. 105: 1071–1080.
- Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. (1999) *Biochemistry of fermentation*. En: *Yoghurt: Science and Technology*. Oxford: Woodhead Publishing. , p. 433-485.
- Tannis, A. (2008) *Probiotics 101*. En *Probiotic rescue: how you can use probiotics to fight cholesterol, cancer superbugs, digestive complaints and more*. (Eds.: Tannis, A) John Wiley & Sons Canada, Ltd. Mississauga, Ontario, Canadá, p 3-12.
- Tannock, G.W. (2003) *Probiotics: time for a dose of realism*. Curr. Issues Intest. Microbiol. 4, 33-42.
- Taranto, M.P.; de Ruiz Holgado, A.P. y de Valdez, G.F. (1995) *Bile salt hydrolase activity in Enterococcus faecium strains*. Microbiologie-Aliments-Nutrition 13: 375–379.
- Taranto, M.P.; Fernández-Murga, M.L.; Lorca, G. y de Valdez, G.F. (2003) *Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of Lactobacillus reuteri*. J. Appl. Microbiol. 95: 86-91.
- Taranto, M.P.; Perez-Martinez, G. y Font de Valdez, G. (2006) *Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration*. Res. Microbiol. 157: 720-725.
- Tejada-Simon, M.V.; Lee, J.H.; Ustunol, Z. y Pestka, J.J. (1999) *Ingestion of yogurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice*. J. Dairy Sci. 82(4): 649-660.
- Theunissen, J.; Britza, T.J.; Torriani, S. y Witthuhn, R.C. (2005) *Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis*. Int. Food Microbiol. 98: 11–21.
- Thiebaud, M.; Dumay, E.; Picart, L.; Guiraud, J.P. y Cheftel, J.C. (2003) *High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation*. Int. Dairy J. 13: 427-439
- Tsuruta, T.; Inoue, R.; Tsukahara, T.; Matsubara, N.; Hamasaki, M. y Ushida, K. (2009) *A cell preparation of Enterococcus faecalis strain EC-12 stimulates the luminal immunoglobulin A secretion in juvenile calves*. Anim. Sci. J. 80: 206-211.

- Vachon, J.F.; Kheadr, E.E.; Giasson, J.; Paquin, P. y Fliss, I. (2002) *Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure*. J. Food Prot. 65: 345-352.
- Van de Guchte, M.; Penaud, S.; Grimaldi, C.; Barbe, V.; Bryson, K.; Nicolas, P.; Robert, C.; Oztas, S.; Mangenot, S.; Couloux, A.; Loux, V.; Dervyn, R.; Bossy, R.; Bolotin, A.; Batto, J.M.; Walunas, T.; Gibrat, J.F.; Bessières, P.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D. y Maguin, E. (2006) *The complete genome sequence of Lactobacillus bulgaricus reveals extensive and ongoing reductive evolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 9274-9279.
- Vannini, L.; Patrignani, F.; Iucci, L.; Ndagijimana, M.; Vallicelli, M.; Lanciotti, R. y Guerzoni, M.E. (2008) *Effect of a pre-treatment of milk with high pressure homogenization on yield as well as on microbiological, lipolytic and proteolytic patterns of "Pecorino" cheese*. Int. J. Food Microbiol. 128: 329-335.
- Vasiljevic, T. y Shah, N.P. (2008) *Probiotics—From Metchnikoff to bioactives*. Int. Dairy J. 18(7): 714-728.
- Verdenelli, M.C.; Ghelfi, F.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cecchini, C. y Cresci, A. (2009) *Probiotic properties of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus paracasei isolated from human faeces*. Eur. J. Nutr. 48: 355-363.
- Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (1999) *Culture media for the enumeration of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus in the presence of yoghurt bacteria*. Int. Dairy. J. 9: 497-505.
- Vinderola, C.G.; Bailo, N. y Reinheimer, J.A. (2000a) *Survival of probiotic microflora in Argentinean yoghurts during refrigerated storage*. Food Res. Int. 33: 97-102.
- Vinderola, C.G.; Prosello, W.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J.A. (2000b) *Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in Argentinean Fresco Cheese*. J. Dairy Sci. 83: 1905-1911.
- Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (2003) *Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*. Food Res. Int. 36: 895-904.
- Vinderola, C.G.; Medici, M. y Perdígón, G. (2004) *Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell*

- wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria*. J. Appl. Microbiol. 96: 230-243.
- Vinderola, C.G.; Duarte, J.; Thangavel, D.; Perdigon, G.; Farnworth, E. y Matar, C. (2005) *Immunomodulating capacity of kefir*. J. Dairy Res. 72: 195-202.
- Vinderola, G.; Briggiler Marcó, M.; Guglielmotti, D.M.; Perdigón, G.; Giraffa, G.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2007) *Phage resistant mutants of Lactobacillus delbrueckii may have functional properties that differ from those of parent strains*. Int. J. Food Microbiol. 116: 96-102.
- Vizoso Pinto, M.G.; Franz, C.M.; Schillinger, U. y Holzapfel, W.H. (2006) *Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products*. Int. J. Food Microbiol. 109: 205-214.
- Voltan, S.; Castagliuolo, I.; Elli, M.; Longo, S.; Brun, P.; D'Inca, R.; Porzionato, A.; Macchi, V.; Palù, G.; Sturniolo, G.C.; Morelli, L. y Martines, D. (2007) *Aggregating phenotype in Lactobacillus crispatus determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa*. Clin. Vaccine Immunol. 14(9): 1138-1148.
- Waar, K.; van der Mei, H.C.; Harmsen, H.J.M.; Degener, J.E. y Busscher, H.J. (2002) *Adhesion to bile drain materials and physicochemical surface properties of Enterococcus faecalis strains grown in the presence of bile*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3855-3858.
- Wall, R.; Fitzgerald, G.; Hussey, S.; Ryan, T.; Murphy, B., Ross, P. y Stanton, C. (2006). *Genomic diversity of cultivable Lactobacillus populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract*. FEMS Microbiol. Ecol. 59: 127-137.
- Walker, J.M. (2005) *The proteomics protocols handbook*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Walter, J.; Tannock, G.W.; Tilsala-Timisjarvi, A.; Rodtong, S.; Loach, D.M.; Munro, K. y Alassatova, T. (2000) *Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species specific primers*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 297– 303.
- Wessel, D. y Flugge, U.I. (1984) *A method for the quantitative recovery of protein in dilute-solution in the presence of detergents and lipids*. Anal. Biochem. 138: 141-143.

- Whitehead, K.; Versalovic, J.; Roos, S. y Britton, R.A. (2008) *Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic Lactobacillus reuteri ATCC 55730*. Appl. Environ. Microbiol. 74 (6): 1812-9.
- Wilkins, J.C.; Homer, K.A. y Beighton, D. (2001) *Altered protein expression of Streptococcus oralis cultured at low pH revealed by two-dimensional gel electrophoresis*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3396-3405.
- Wuytack, E.Y.; Diels, A.M.J. y Michiels, C.W. (2002) *Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure*. Int. J. Food Microbiol. 77: 205–212.
- Yaday, H.; Jain, S. y Sinha, P.R. (2007) *Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei during fermentation and storage*. Int. Dairy J. 17: 1006-1010.
- Young, J.P.W.; Downer, H.L. y Eardly, B.D. (1991) *Phylogeny of the prototrophic Rhizobium strain BTail by polymerase chain reaction- based sequencing of a 16S rRNA segment*. J. Bacteriol. 173: 2271–2277.