



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Análisis de los complejos multiproteínicos de
Bifidobacterium longum por Electroforesis Blue Native
de doble dimensión, efecto del sustrato.

Tesis que presenta

Julia Anahí Acosta Munguía

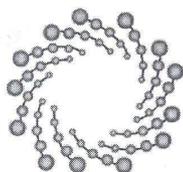
Para obtener el grado

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S. L.P., 9 Julio de 2010



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Análisis de los complejos multiproteínicos de *Bifidobacterium longum* por Electroforesis Blue Native de doble dimensión, efecto del sustrato” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Julia Anahí Acosta Munguía** y aprobada el **28 de 06 de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Director de la tesis

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Asesor de la tesis

Dra. Ana Silvia Pérez Martínez
Asesor de la tesis



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 223336 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 073 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular esta asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2010, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Presidenta	IPICYT
Dra. Ana Silvia Pérez Martínez	Secretario	CINVESTAV
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustenta la C.

Julia Anahí Acosta Munguía

sobre la Tesis intitulada:

Análisis de los complejos multiproteínicos de Bifidobacterium longum por Electroforesis Blue Native de doble dimensión, efecto del sustrato.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determino

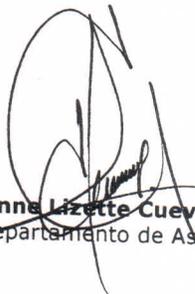
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma conlleva, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México a los 13 días del mes de julio de 2010.


Dr. Marcial Bonilla Marin
Secretario Académico




Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

DEDICATORIAS

A MIS PADRES LORENZO Y MARÍA DE LOS ÁNGELES
A MIS HERMANOS LORENZO ANTONIO Y ÁNGEL ORLANDO
A MI NOVIO ENRIQUE
A MIS ABUELITOS
A MIS TÍOS Y PRIMOS
A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por permitirme ser parte de su laboratorio, por su tiempo y dedicación.

A la Dra. Martha Leticia Santos Martínez por sus comentarios y la disposición en la revisión de la tesis.

A la Dra. Ana Silvia Pérez Martínez por su enseñanza, opiniones y correcciones a este trabajo.

Al M. C. Alberto Barrera Pacheco por su apoyo en el laboratorio y su ayuda con los resultados de espectrometría de masas

Al M. C. José Luis Martínez Salgado por su amistad y apoyo en el laboratorio.

A mis Compañeros de laboratorio 2.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría

A todas las personas involucradas en la realización de esta tesis

ÍNDICE GENERAL

	Pag
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I . RESUMEN	xi
II. ABSTRACT	xii
III. INTRODUCCIÓN	1
3.1 Antecedentes de <i>Bifidobacterium</i>	1
3.2 Características del género <i>Bifidobacterium</i>	2
3.3 <i>Bifidubacterium longum</i>	5
3.4 Probióticos	6
3.5 Prebióticos	7
3.6 Fructanos	9
3.7 Simbióticos	12
3.8 Proteómica	12
3.8.1 Caracterización de proteínas	14
IV. JUSTIFICACIÓN	17
V. OBJETIVO	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Microorganismos y medio de cultivo	20
6.2 Cinética de crecimiento	20
6.3 Preparación de los complejos celulares	20
6.4 Cuantificación de proteínas	21
6.5 Electroforesis bidimensional	22
6.5.1 Primera dimensión: Blue Native	22
6.5.2 Segunda dimensión: SDS/PAGE	22

6.6 Tinción	23
6.6.1 Tinción con Sypro® Ruby	23
6.6.2 Tinción con azul brillante de Coomassie	23
6.7 Análisis de los geles	23
6.8 Digestión de las proteínas	24
6.9 Espectrometría de masas	25
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
7.1 Cinética de crecimiento de <i>B. longum</i>	26
7.2 Electroforesis Blue Native	28
7.3 Complexoma de <i>B. longum</i>	32
7.4 Análisis de los geles	34
VIII. CONCLUSIONES	39
IX. REFERENCIAS	40
X. APÉNDICES	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Efecto prebiótico de varios oligosacáridos	9
Tabla 2. Preparación de la curva de calibración para el análisis de Bradford	21
Tabla 3. Crecimiento máximo de <i>B. longum</i> en las diferentes fuentes de carbono	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1 La forma bifurcada es la característica del género <i>Bifidobacterium</i>	3
Figura 2 Vía metabólica de <i>Bifidobacterium</i> .	4
Figura 3 Principales estructuras de fructanos	11
Figura 4 Diagrama ilustrativo de la técnicas BN/SDS-PAGE	14
Figura 5 Pasos para la identificación de una proteína mediante espectrometría de masas	16
Figura 6 Cinética de crecimiento de <i>B. longum</i>	27
Figura 7 Comparación de la separación BN-PAGE en dos cámaras diferentes de electroforesis	29
Figura 8 Comparación de la separación en la segunda dimensión	30
Figura 9 Complexoma de <i>Bifidobacterium longum</i> crecido en Glucosa como sustrato por 20 h a 37°C..	31
Figura 10 Perfil 2-D BN/SDS-PAGE de proteínas de complejos citosólicos de <i>B. longum</i> con Glucosa como fuente de carbono	32
Figura 11 Perfil 2-D BN/SDS-PAGE de proteínas de complejos citosólicos de <i>B. longum</i> con fructanos como fuente de carbono	33
Figura 12 Análisis con el software Melanie V7.0.	35
Figura 13 Análisis semi-cuantitativo de una mancha disminuida en intensidad	36
Figura 14 Análisis semi-cuantitativo de los geles bidimensionales de <i>B. longum</i> (Fase exponencial)	37
Figura 15 Análisis semi-cuantitativo de los geles bidimensionales de <i>B. longum</i> (Fase estacionaria)	38

I.RESUMEN

Bifidobacterium longum es una de las especies bacterianas nativas de la flora intestinal, conocida como probiótica; es decir, que proporciona beneficios a la salud del huésped. En el intestino los probióticos consumen preferentemente azúcares no digeribles por el huésped como los fructanos que se encuentran en las plantas y son conocidos como prebióticos. El estudio del proteoma (todos los complejos de proteínas de la célula), ayuda a tener una mejor comprensión y una visión global de la función celular. La doble-dimensión Blue Native (BN)/SDS-PAGE fue inicialmente reportada para analizar complejos de proteínas de membrana. En el presente trabajo hemos aplicado la técnica BN/SDS-PAGE para caracterizar los complejos citoplásmicos en *B. longum*, cepa ATCC 15707 y sus cambios cuando se tiene como fuente de carbono glucosa o fructanos. Para ello se optimizó la electroforesis BN y el uso de tricina en lugar de glicina mejoró la separación. Fue posible identificar 53 proteínas agrupadas en 8 complejos, además de identificar las proteínas expresadas diferencialmente en las diferentes fuentes de carbono. Las proteínas componentes de los complejos fueron identificadas por espectrometría de masas.

II. ABSTRACT

Bifidobacterium longum is one of the bacterial species native of the intestinal flora, it is known as a probiotic, i.e. bacteria that provide health benefits to the host. In the intestine, the probiotics consume indigestible sugars preferentially by the host as fructans found in plants and are known as prebiotics. The study of the complexoma interest (all protein complexes in the cell), is helps in the understanding and to have a overview of cellular function. The two-dimensional Blue Native BN/SDS-PAGE was initially reported for analysis of membrane protein complexes. In this study we assessed the study of cytoplasmic protein that form complexes in *B. longum* ATCC 15707 in the presences of fructans as a carbon source by this method. BN electrophoresis was improved by using tricine instead of glycine. It was possible to identify 53 proteins grouped into eight complexes, and identify differentially expressed proteins in different carbon sources. The protein components of the complex were identified by mass spectrometry

III. INTRODUCCIÓN

3.1 Antecedentes de *Bifidobacterium*

Bifidobacterium fue aislada por primera vez en 1899 por Henry Tissier del Instituto Pasteur en Francia y reportó que estos bacilos eran la flora predominante en heces de infantes alimentados con leche materna y les dio el nombre de *Bacillus bifidus communis*. Durante gran parte del siglo XX, debido a su forma alargada y a sus características de fermentación se les clasificó dentro del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus bifidus*. La primera referencia de bifidobacterias fue realizada en 1924 por Orla-Jensen, quien propuso el género *Bifidobacterium* (Leahy et al., 2005). En la década de 60's la clasificación de las especies de *Bifidobacterium* era incierta ya que se basaba principalmente en sus características morfológicas y pruebas bioquímicas, por lo que eran confundidas con bacterias de diversos géneros como *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium* (Axelsson, 1998). Se consideraron principalmente tres características para su aceptación como un género independiente: la fermentación de azúcares (Biavanti et al., 2000; Reuter 1963), la presencia de la enzima fructosa 6-fosfato fosfoacetolosa (F6PPK) (Stouthamer, 1967) y el alto contenido de G+C en el ADN (Embley y Stackebrandt 1994).

Las bifidobacterias se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal humano. *Bifidobacterium* contiene seis grupos filogenéticos: *B. boum*, *B. asteroides*, *B. adolescentes*, *B. longum*, *B. pullorum* y *B. pseudolongum*. Más de 30 especies del género *Bifidobacterium* se han aislado de diferentes ambientes tales como: aguas residuales, intestino de insectos, cavidad oral, alimentos y

leches fermentadas, pero probablemente su hábitat natural se considera el intestino del hombre y otros mamíferos de sangre caliente.

Actualmente el género *Bifidobacterium* está clasificado en el dominio Bacteria dentro de la clase *Actinobacteria* en la subclase *Actinobacteridae*, el orden *Bifidobacteriales* y la familia *Bifidobacteriaceae*.

3.2 Características del género *Bifidobacterium*

Bifidobacterium es un bacilo pleomórfico anaerobio, Gram-positivo, no esporulado, catalasa negativa, originalmente llamado *Bacillus bifidus communis*. El nombre representa la morfología de ramificación de las bacterias; bifidus en latín, y significa dividida en dos partes (Figura 1).

Las principales características fenotípicas de *Bifidobacterium* es la producción de ácido acético y ácido láctico en una relación molar 3:1 al degradar una gran cantidad de carbohidratos, principalmente glucosa, sin producir CO₂ (Axelsson, 1998). La asimilación de la glucosa es llevada a cabo exclusivamente por la enzima F6PPK, clave en el metabolismo de *Bifidobacterium* (Figura 2) (Scardovi et al., 1971; Scardovi y Trovatelli, 1965).

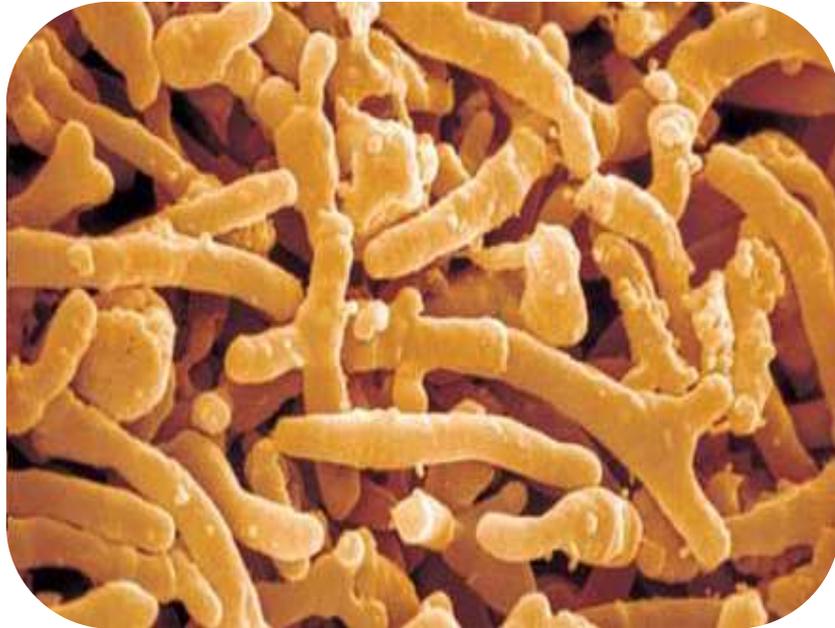
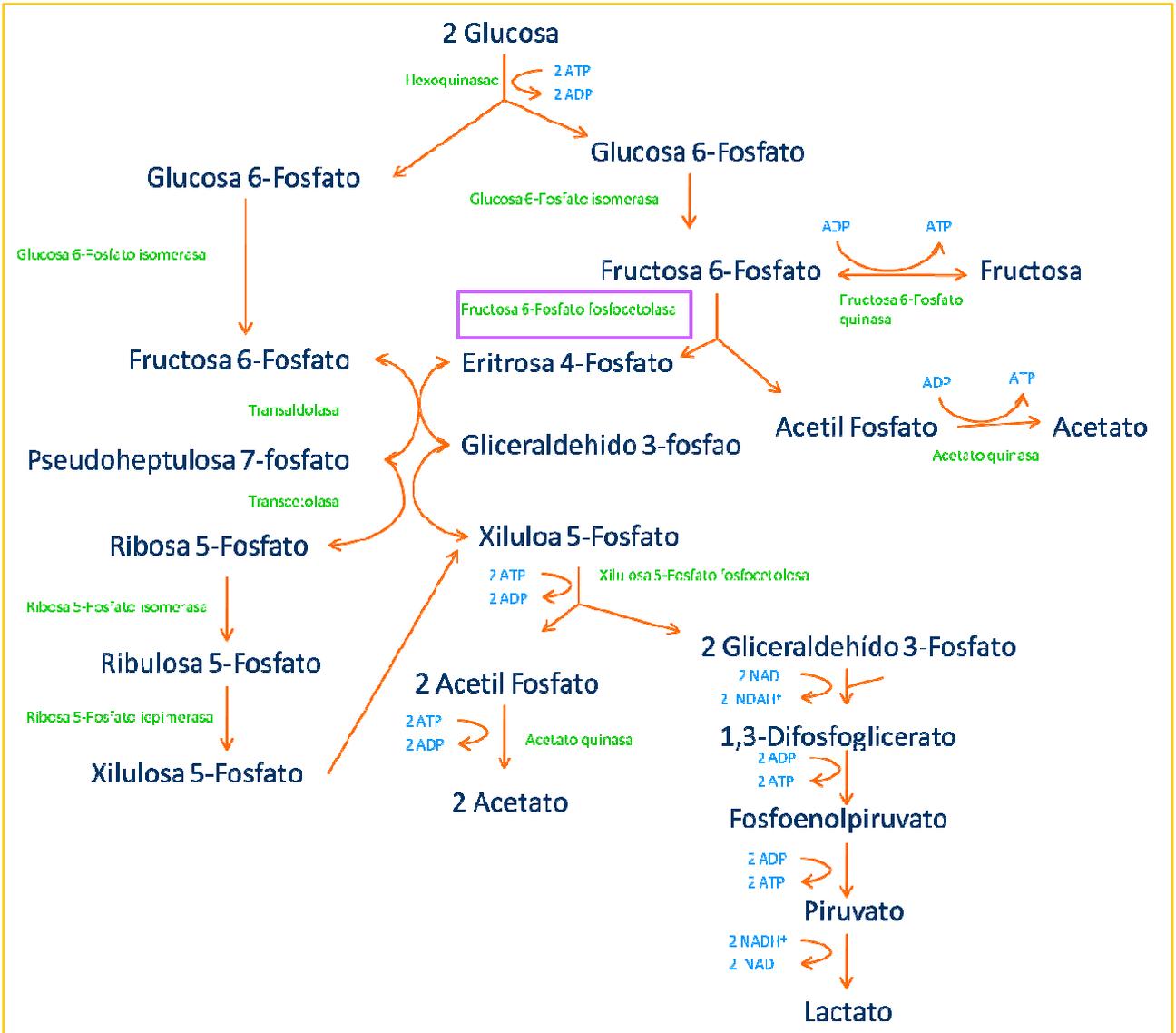


Figura 1. La forma bifurcada es característica del género *bifidobacterium*. *Bifidobacterium longum*



um. La enzima

3.3 *Bifidobacterium longum*

Bifidobacterium longum se reportó por primera vez en 1963 (Reuter 1963). Se encuentra en el colon de humanos en todos los grupos de edad. *B. longum* es la única especie de *Bifidobacterium* capaz de fermentar el trisacárido melezitosa y la arabinosa. *B. longum* ha sido muy utilizado para realizar estudios enfocados al efecto que tiene en la salud del huésped como probiótico. (Ballongue 1998).

Se ha reportado que *B. longum* estimula el sistema inmune (Picard et al., 2005); es capaz de secretar proteínas que inhiben la adhesión de patógenos potenciales (Lieving et al., 2000), ayuda al organismo huésped a resistir infecciones por bacterias patógenas como *Escherichia. coli* (Ishibashi y Yamazaki 2001) y *Salmonella typhimurium* (Leahy et al., 2005). Otros estudios han demostrado que *B. longum* inhibe la inducción del cáncer de colon de ratas (Picard et al., 2005; Gallaher y Khil, 1999). Se ha mostrado una acción efectiva contra tumores de hígado, focos aberrantes en las criptas del intestino y diarreas asociadas a antibióticos (Ballongue, 1998; Leahy et al., 2005; Picard et al., 2005). La persistencia de *B. longum* en el colon puede ser resultado de su capacidad para utilizar sustratos, que son pobremente digeridos por el huésped o por otros microorganismos presentes en tracto gastrointestinal (*E. coli*, *Enterococos* eubacterias, etc.), los cuales utilizan los azúcares y polímeros más abundantes como pectinas y almidón. Se ha reportado que las concentraciones de carbohidratos de alto peso molecular son menores en el colon que en el íleon, lo que implica que estos carbohidratos complejos son degradados y utilizados en el colon (Schell et al., 2002).

El genoma de *B. longum* NCC2705 posee un gran número de genes relacionados con el metabolismo de oligosacáridos, comprende más del 8% del genoma, cuenta con más de 40 proteínas con actividad de glicosilhidrolasas y se ha predicho la actividad de dos xilasas, nueve arabinosidasas, dos α -galactosidasa, neopullanasa, isomerasa, maltasa, inulinasa (β -fructofuranosidasa), cuatro β -galactosidasa, tres β -glucosidasas, tres hexosaminidasas y tres α -manosidasas (Schell et al., 2002)

3.4 Probióticos

Lilly y Stillwell en 1965 utilizaron por primera vez el término probiótico para definir cualquier sustancia u organismo que mejorase el equilibrio microbiano intestinal (Leahy et al., 2005). Posteriormente Fuller en 1989 lo definió como un suplemento alimentario microbiano vivo que afecta de forma beneficiosa al animal huésped a través de la mejoría de su balance microbiano intestinal (Biavati et al., 2000).

Según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2001) los probióticos se definen como: "*Microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas*".

Las bifidobacterias afectan la eco-fisiología de la microbiota intestinal, además de interactuar directamente con el metabolismo del huésped. Las bacterias son capaces de pasar todo el tubo digestivo y recuperarse vivos en las heces, pero también son capaces de adherirse y pueden influir en la composición

de la mucosa. Esta colonización incrementa la resistencia a infecciones por patógenos (Ballongue, 1998).

Las bifidobacterias se emplean en alimentos como probiótico. Los efectos nutricionales causados por las bifidobacterias incluyen la inducción de las vitaminas y ácido láctico. El mejoramiento de la intolerancia a la lactosa, la hipercolesterolemia y los ácidos biliares son considerados como el resultado del metabolismo de las bifidobacterias en el colon. Las bifidobacterias también muestran poseer actividad anticarcinogénica e inmunoestimuladora (Erickson y Hubbard 2000; Rowland et al., 1998; Pickering et al., 1998).

3.5 Prebióticos

Gibson y Robertfroid en 1994 definieron a los prebióticos como moléculas fermentables (substratos añadidos al ecosistema) que poseen un efecto favorable sobre la flora intestinal, estimulando el crecimiento selectivo de bacterias del colon. Los prebióticos utilizados por el hombre son las fibras, lactulosa, lactiol, inulina, galactooligosacáridos y fructooligosacáridos. Muchos de estos prebióticos se encuentran de manera natural en alimentos que consumimos habitualmente por ejemplo en las cebollas, espárragos, ajos, alcachofas, etc.

La clave del prebiótico reside en ser capaz de resistir los ácidos gástricos, la hidrólisis enzimática y la absorción intestinal, esto es: que no sea digerible por el tracto gastrointestinal, y que haya una cantidad significativa disponible para ser fermentada por los microorganismos intestinales, permitiendo cambios específicos

en la composición y/o actividad de las bacterias intestinales benéficas que les confiere ventajas sobre otras patógenas (Roberfroid 2007).

Los requisitos precisos para que un alimento o componente alimentario pueda considerarse como un prebiótico son los siguientes:

- No debe ser hidrolizado, digerido ni absorbido en el intestino delgado
- Debe ser fermentado selectivamente por bacterias que favorezcan la salud al huésped y deben ser fermentado total o parcialmente por la flora del tracto gastrointestinal.
- Debe ser sustrato de una a varias bacterias beneficiosas estimulando de manera selectiva su crecimiento y así favorecer el equilibrio de la flora del tracto gastrointestinal.

La mayor parte del trabajo realizado en el campo de los prebióticos, involucra el empleo de los oligosacáridos (Tabla 1); aunque a la fecha solo los fructooligosacáridos y los galactooligosacáridos, usados como ingredientes alimentarios, satisfacen los criterios para ser clasificados como prebióticos (Roberfroid, 2007).

Tabla 1. Efecto prebiótico de varios oligosacáridos

Carbohidrato	Indigestibilidad	Fermentación	selectividad	Prebiótico
Inulina y oligofruktosa	Si	Si	Si	Si
Galactooligosacáridos	Posible	??	Si	Si
Lactulosa	Posible	??	Si	Si
Isomaltooligosacáridos	Parcial	Si	Promete	No
Lactosacárosa	ND	ND	Promete	No
Xilooligosacárido	ND	ND	Promete	No
Oligosacáridos de soya	ND	ND	ND	No
Glucooligosacaridos	ND	ND	ND	No

ND, No determinado; ??, datos preliminares que requieren investigación

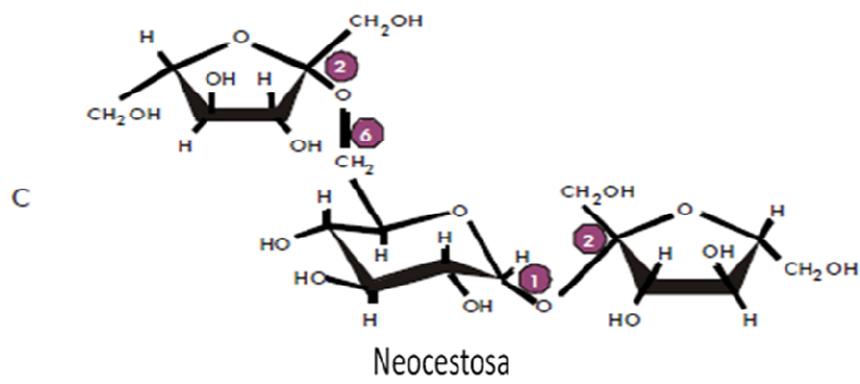
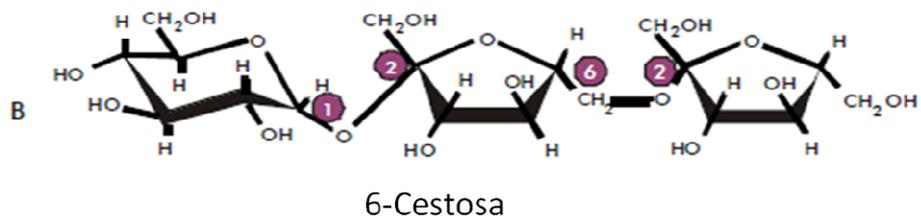
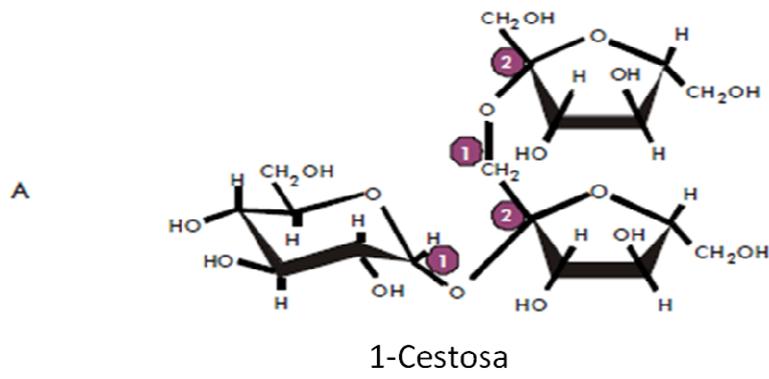
3.6 Fructanos

En la naturaleza, la síntesis de fructanos ocurre a partir del sustrato sacarosa en varias especies de microorganismos y plantas. Los fructanos pueden tener desde dos hasta cientos de miles de residuos de fructosa unidos por enlaces β -(2-1) (inulina) o β -(2-6) (levana). Los fructanos más estudiados son polímeros de fructosas lineales y ramificados. Se encuentran en un 15 % del reino vegetal, se sintetizan a partir de la sacarosa, por la acción de dos o más fructosiltransferasas con diferente especificidad de sustrato, que evolucionaron a partir de las invertasas. Los fructanos de plantas presentan diferencias en las estructuras y longitud de sus cadenas (Banguela y Hernández, 2006).

El fructano linear más simple es la inulina, consiste de residuos de fructosil . La molécula de inulina más corta es el trisacárido 1-cestosa mostrado en la Figura 3A. Las neoserias de inulina tienen dos cadenas de fructosas con enlaces $\beta(1-2)$ ligadas a una molécula de sacarosa inicial, una cadena se encuentra unida al carbono 1 (C1) de la fructosa y la otra esta unida al carbono 6 (C6) de la glucosa. Los levanos contienen unidades de fructosa conectadas por enlaces $\beta(2-6)$ como la 6-cestosa mostrado en la Figura 3B. Pueden encontrarse fructanos mixtos, los cuales consisten de residuos de fructosa unidos por un enlace $\beta(2-6)$ con ramificaciones $\beta(2-1)$ como es el caso de la neocestosa mostrado en la figura Figura 3C. (Banguela y Hernandez, 2006; Vijin y Semeekens, 1999). Los fructanos llegan al colon sin ser degradados y son fermentados selectivamente por las bifidobacterias; esta selectividad permite la disminución de otras bacterias y consecuentemente se reduce la actividad enzimática para convertir carcinogénicos en su forma activa. (Buddington et al., 1996).

El sistema gastrointestinal humano no contiene enzimas capaces de degradar fructanos, por lo tanto, existe gran interés en el sector alimentario por utilizar estos compuestos como ingredientes con pocas calorías y fibra dietética (Ritsema y Smeekens 2003)

Se ha observado que en una dieta rica en fructanos, se disminuyen las concentraciones de colesterol, triacilglicerol y fosfolípidos en suero (Ritsema y Smeekens 2003). El aporte de polifruktanos en la dieta normal occidental (inulina y fructo-oligosacáridos), se ha establecido entre 3 y 12 gramos al día..



A) 1-cestosa,

3.7 Simbióticos

Los simbióticos son una mezcla de probióticos y de prebióticos, se mejora la sobrevivencia y la implantación en el tracto gastrointestinal de microorganismos vivos administrados como suplementos dietéticos (Ballabriga, 2001).

En el estudio de los alimentos se ha surgido el concepto de “alimento funcional” (AF). Son aquellos alimentos que son elaborados no sólo por sus características nutricionales sino también para cumplir una *función específica* como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Para ello se les agregan componentes biológicamente activos, como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia (prebióticos), probióticos o antioxidantes, etc.

Los AF más populares son el conjunto de alimentos fermentados por bifidobacterias y lactobacilos. Pertenecen al grupo de AF denominado probióticos, los cuales ejercen un efecto favorable en el ecosistema del colon, por lo cual han recibido un mayor interés en la investigación (Ferrer y Dalmau 2001).

3.8 Proteómica

La proteómica es la caracterización a gran escala del proteoma de una línea celular, tejido u organismo en un momento dado y bajo ciertas condiciones (Anglade et al., 2000). El complexoma representa todas las proteínas, las cuales están involucradas en los diferentes complejos proteínicos. La identificación y caracterización de complejos multiproteínicos son pasos importantes en la obtención de una visión integral de las redes de interacciones proteína-proteína que determinan la función y el comportamiento celular (Pyndiah et al., 2007; Lasserre et al., 2006).

La electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (BN-PAGE) es una técnica empleada para la separación de complejos de proteínas solubles. Este método se basa en la separación de las proteínas en una primera dimensión utilizando Azul brillante de Coomassie G-250, que se une a la superficie de todas las proteínas, en particular sobre los residuos aromáticos y en argininas, la unión de una gran cantidad de colorante con carga negativa, facilita la migración de los complejos multiproteínicos en la primera dimensión, reduciendo la degradación de las proteínas considerablemente. Los complejos se separan de acuerdo a su tamaño y forma. Cada complejo se desnaturaliza y sus componentes se separa en segunda dimensión (SDS/PAGE), el alineamiento de proteínas permite la identificación de la interacción entre proteínas (Camacho et al., 2004) (Figura 4).

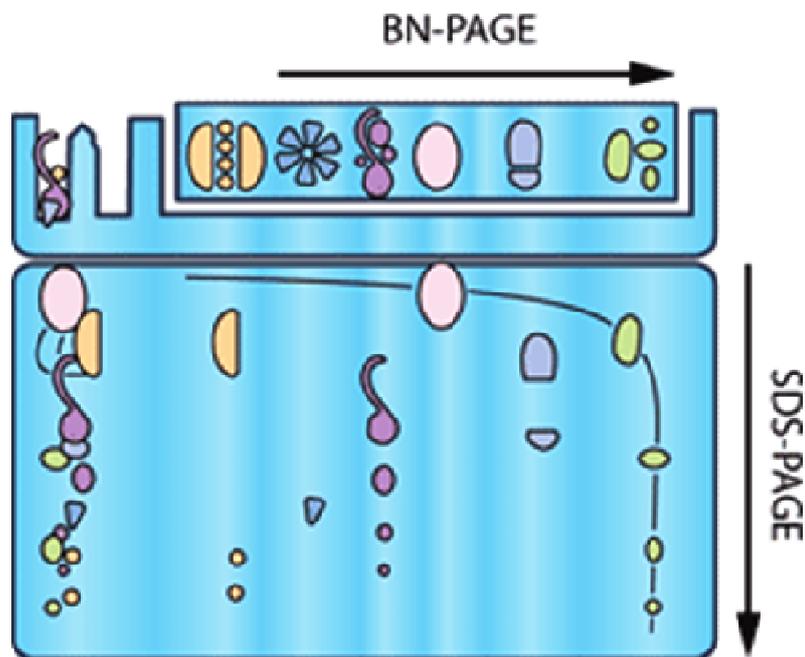


Figura 4. Ejemplificación de la técnica BN/SDS PAGE

La electroforesis bidimensional azul nativa y el análisis por espectrometría de masas, está contribuyendo en gran manera a la investigación experimental de la interacción entre proteínas de sistemas biológicos complejos. Esta herramienta tiene éxito al estudiar la cantidad y localización subcelular de complejos de proteínas (Pyndiah et al., 2007; Reisinger et al., 2008)

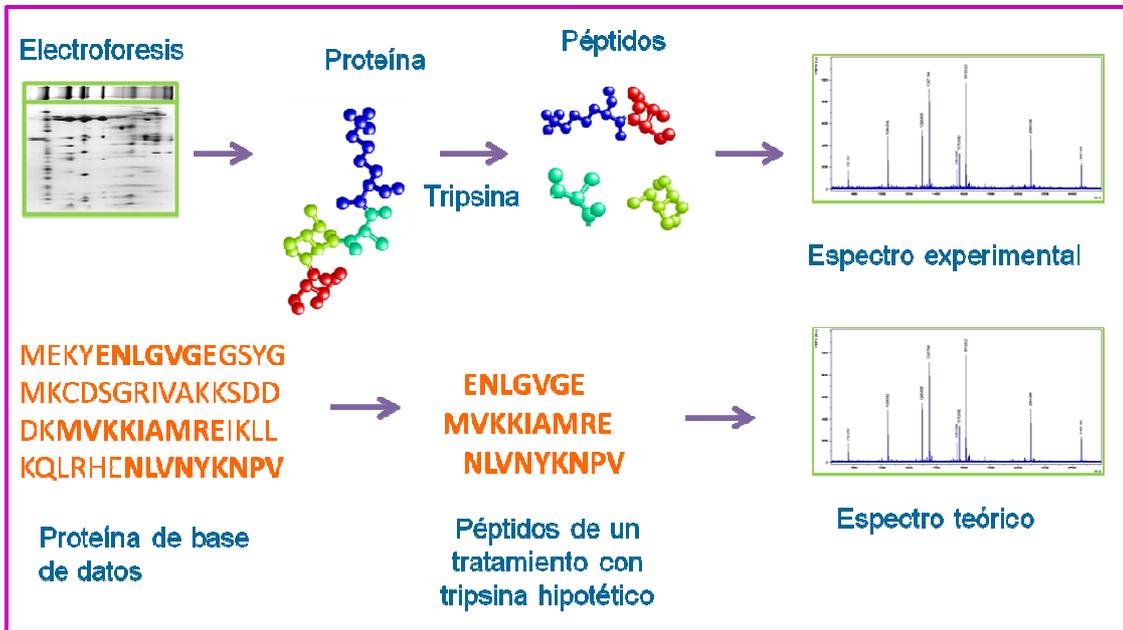
3.8.1 Caracterización de proteínas

En los estudios proteómicos, la identificación de las proteínas es el primer paso para su caracterización funcional. La espectrometría de masas permite obtener información estructural de las proteínas, como es, la masa de los péptidos

o la secuencia de aminoácidos. Esta técnica implica básicamente la extracción de proteínas del gel, digestión con tripsina para posteriormente convertir los péptidos en iones en fase gaseosa mediante la ionización por desorción de la matriz asistida por láser (MALDI), electrospray (ESI), ionización de campo (FI), etc. (Vestal 2001; Vestal et al., 1998), seguida de la separación de los iones según su relación masa/carga (m/z) en un analizador de masas de tiempo de vuelo, cuadrupolo etc. La detección de las masas proporciona un espectro que refleja la abundancia de los iones frente a su valor m/z (Figura 5) (Aebersold y Goodlett 2001). Esta información puede identificar a la proteína al proporcionar su huella peptídica y compararla con las masas peptídicas teóricas de proteínas presentes en bases de datos (Graves y Haysted, 2002).

La electroforesis "Blue Native" SDS/PAGE se han empleado en el estudio del complexoma de proteínas de citoplasma y membrana de *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* y en líneas celulares de mamíferos (HEK293-EBNA, HeLa, Jurkat) (Pyndiah et al., 2006, Camacho et al., 2004, Lasserre et al., 2006).

El conocimiento de la composición y/o estructura de estos complejos multiproteínicos resulta en un mayor entendimiento de las vías metabólicas y procesos celulares, que la sola identidad de una proteína no es capaz de aportar. Debido a que muchos de los procesos celulares requieren la acción de varias enzimas, a menudo cada uno con múltiples subunidades, para elevar la eficiencia, la especificidad y la rapidez de la respuesta metabólica, estas proteínas son asociadas a otras proteínas, formando de manera temporal o estable grandes complejos de proteínas.



teína, mediante

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a los beneficios a la salud que los alimentos funcionales ofrecen al consumidor, la industria alimentaria ha tenido un gran interés en el desarrollo de éstos, en especial aquéllos que contengan bacterias benéficas (probióticos) y/o compuestos que favorezcan el crecimiento de estas (prebióticos). En la industria alimentaria *B. longum* es uno de los microorganismos más utilizados como probióticos, debido a que resisten el pH ácido del estómago, logrando llegar viables al colon, donde por ser capaz de utilizar una gran variedad de azúcares o carbohidratos no digeribles tales como: fructooligosacaridos, arabinosas, xilosa, ribosa etc., se favorece su proliferación.

Se ha hecho evidente que los procesos celulares se llevan a cabo por sofisticadas maquinarias de proteínas asociadas en complejos enzimáticos. El complejo en un sistema biológico representa todas las proteínas que trabajan en forma asociada - en complejos. Las interacciones proteína-proteína se han estudiado por métodos complementarios como el sistema de dos-híbridos, la inmunoprecipitación o co-purificación, a pesar de que estos procedimientos han dado un entendimiento de las interacciones entre proteínas, los problemas técnicos (biocompatibilidad, desnaturalización y sustrato) continúan presentándose. La técnica Blue-Native SDS/PAGE se ha aplicado para la separación de los complejos de membranas de mitocondrias y cloroplastos; modificaciones a esta técnica han permitido la separación de complejos totales de *Helicobacter pilori*, *Escherichia coli* y células HeLa, dando una visión global de las interacciones proteína-proteína.

Debido a los beneficios nutricionales y nutracéuticos que brindan los probióticos y prebióticos a la salud del huésped en el presente trabajo evaluaremos el complexoma de *B. longum* y los cambios en las asociaciones proteína-proteína al emplear como fuente de carbono la glucosa o los fructanos. Los resultados obtenidos ampliarán el conocimiento del metabolismo de esta bacteria.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar los cambios producidos en el complexoma de *Bifidobacterium longum* al utilizar glucosa o fructanos como fuente de carbono.

Objetivos específicos:

1. Estandarizar la extracción de los complejos proteínicos de *Bifidobacterium longum* en condiciones nativas.
2. Estandarizar la metodología de Blue-Native SDS/PAGE, para la separación de las especies que conforman a los complejos proteínicos de *Bifidobacterium longum*.
3. Identificar las proteínas diferenciales mediante espectrometría de masas y análisis bioinformático.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos y medio de cultivo

Para el crecimiento de *Bifidobacterium longum* ATCC15707 se preparó el medio Mann Rogosa & Sharpe (MRS) (Apéndice A) suplementado con L- cisteína 0.05% (p/v). La cepa se reactivó en este medio y posteriormente se realizó una dilución 1:100 con medio fresco. Para evaluar el efecto de los fructanos sobre el cultivo bacteriano, se preparó medio MRS con glucosa o con fructanos a una concentración de 20 g/L (SIGMA-ALDRICH), los azúcares fueron esterilizados por separados.

6.2 Cinética de crecimiento

Los cultivos de *B. longum* fueron incubados a 37°C por 48 h en una jarra de anaerobiosis. Se tomaron muestras cada 3 horas y se midió la densidad óptica a 600 nm.

6.3 Preparación de los complejos celulares

Las células fueron empaquetadas por centrifugación a 8000 rpm por 10 min a 4 °C, las pastillas se lavaron cuatro veces con Tris 0.1M, pH 7.5. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 500 µL de buffer de extracción nativo que contiene: ácido amino caprónico 750 mM , Tris/HCl 50 mM, pH 7.0 a 4° C suplementado con PMSF 1 mM (Pyndiah 2007). La suspensión se sonicó a intervalos de 9.9 segundos por 1.5 min, a una amplitud de 21%, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C para recuperar el sobrenadante (complejos solubles), el pellet fue almacenado a -20°C para su análisis posterior. La solución con los

complejos se concentró empleando centricones de 50 kDa (Millipore), finalmente el concentrado se almacenó a -20°C para su análisis posterior.

6.4 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron utilizando el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad). Se preparó albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich) a una concentración final de 1.4 mg/mL y se prepararon diluciones como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración para el análisis de Bradford

Estándar	Concentración mg/mL	BSA (μL)	Agua (μL)
1	0,0	0	200
2	0,2	29	171
3	0,4	57	143
4	0,6	86	114
5	0,8	114	86
6	1,0	143	57
7	1,2	171	29
8	1,4	200	0

Se preparó 1 parte del reactivo concentrado con 4 partes de agua MilliQ, a continuación 20 μL de cada estándar o muestra se mezclaron con 1 mL de reactivo diluido. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por al menos 5 min, posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm y se comparó con la curva de calibración de BSA para determinar la concentración de las proteínas en las muestras problema.

6.5 Electroforesis bidimensional

6.5.1 Primera dimensión: Blue Native

Se utilizaron geles con dimensiones de 22 cm X 16.5 cm X 1.0 mm . Se trabajó con gradientes lineares de poliacrilamida del 7 al 16 %. El Buffer de cátodo (Apéndice D) se suplementó con Serva Blue G 0.002 % . Se prepararon 50 μL de cada una de las muestras, a una concentración de 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, para darle carga a las proteínas se añadió Serva Blue G (0.002 %) 1 μL por cada 10 μL de muestra. La electroforesis se realizó durante toda la noche a 100 V a 4°C. Los estándares de peso molecular incluyen: Tiroglobulina (669 kDa), Ferritina (440 kDa), Catalasa (232 kDa), Lactato deshidrogenasa (140 kDa) y albúmina de suero bovina (67 kDa). Al término de la electroforesis, se cortó el carril de cada muestra y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

6.5.2 Segunda dimensión: SDS PAGE

La separación por peso molecular de los complejos proteínicos obtenidos en la primera dimensión, se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes comparando el método tris-Glicina con el método tris-tricina (Ver apéndice). Las tiras cortadas de los geles BN-PAGE se equilibraron por 30 min en 20 mL buffer de solubilización BN (ver apéndice). Posteriormente, la tira se colocó sobre el gel (SDS-PAGE) y se fijó con agarosa al 0.5% (ver apéndice). Los geles se corrieron utilizando buffer de cátodo y ánodo (apéndice D) a 30 V hasta que la muestra alcanzara el gel separador y posteriormente se aumento a 90 V constantes durante toda la noche a 4°C.

6.6 Tinción

6.6.1 Tinción con Sypro® Ruby

Los geles se sumergieron durante 1 hora en solución de fijado (metanol 50 %, ácido acético 10%) con agitación lenta, después de lavarlos 3 veces con agua Milli-Q durante 10 min en agitación. Una vez lavados, se sumergieron en Sypro® Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes™) y se agitaron durante toda la noche protegidos de la luz. Después se descartó el Sypro® Ruby y se agregó solución de lavado (metanol 10 %, ácido acético 7%) y se agitaron durante 30 min, después se realizaron tres lavados con agua Milli-Q.

6.6.2 Tinción con azul brillante de Coomassie

Los geles se sumergieron en solución de fijado (metanol 50%, ácido acético 10%) durante 30 minutos mantenidos en constante agitación, una vez retirada la solución de fijado se sumergieron durante toda la noche en la solución de azul brillante de Coomassie G-250 al 0.025% y se mantuvo en agitación constante, se destiñeron mediante varios lavados con solución de desteñido (metanol 50%, ácido acético 10%) hasta observar el fondo claro de los geles libres de tinción de fondo y se lavaron varias veces con agua Milli-Q hasta que los geles estuvieron libres de metanol .

6.7 Análisis de los geles

Los geles se analizaron con el programa Melanie V7.0, este software evita errores debido a la edición manual y elimina puntos tenues o sobrelapados. Ayuda a reducir el tiempo dedicado a encontrar cambios significativos en la expresión de proteínas, generando una imagen con puntos que pueden ser

identificados, para obtener la cantidad de puntos presentes en cada gel y compararlos cualitativa y semi-cuantitativamente entre sí marcando las diferencias entre ellos.

Las manchas diferenciales encontradas en los geles se cortaron manualmente con puntas estériles y almacenadas en tubos eppendorf para proceder con la digestión con tripsina.

6.8 Digestión de las proteínas

Las manchas cortadas se lavaron por 10 min con agua MilliQ, seguido de un lavado de 5 min con una solución de carbonato de amonio (NH_4HCO_3) 100 mM de en metanol 50% a 37°C con agitación. La mancha se deshidrató cubriéndola con acetonitrilo (ACN) al 50% por 5 min, el proceso se repitió tres veces y finalmente se secó en speed-vac. La mancha se rehidrató con solución de NH_4HCO_3 25 mM conteniendo ditioneitol (DTT) 10 mM a pH 8. La muestra se incubó por 30 min a 56°C. Después de este tiempo se eliminó la solución y la muestra se enjuagó con ACN. Se añadió nuevamente NH_4HCO_3 25 mM pero ahora conteniendo iodoacetamida 55 mM (10 mg/mL) y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después de este tiempo, la muestra se lavó con ACN 50% por 5 min, y NH_4HCO_3 25 mM, y se secó en speed-vac. La tripsina (Promega) se añadió a una concentración de 8 ng/ μL en NH_4HCO_3 25 mM y la muestra se incubó por toda la noche a 37°C.

6.9 Espectrometría de masas.

Los péptidos obtenidos de la digestión se separaron mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Presión UPLC (Waters), la muestra pasó por la precolumna Symmetry C18 5 μ m de 180 μ m X 20 mm seguido por la columna BEH130 C18 1.7 μ m, 100 μ m x 100 mm, donde los péptidos se eluyen con un gradiente de ACN/H₂O, los péptidos eluidos se inyectan directamente al espectrómetro de masas. Para la medición el espectrómetro de masas fue operado en el modo "V", con un poder de resolución normal. Todos los análisis fueron realizados usando ionización por electrospray, en el modo de ion positivo ESI (+). La muestra se analizó por MS/MS donde se rompe mediante colisión inducida por electrones. El análisis se realizó por tiempo de vuelo (TOF). Los datos de m/z obtenidos de el espectrómetro de masas fueron analizados empleando el programa Mascot (Matrix science), empleando la base de datos de NCBI no redundante (<http://www.matrixscience.com>).

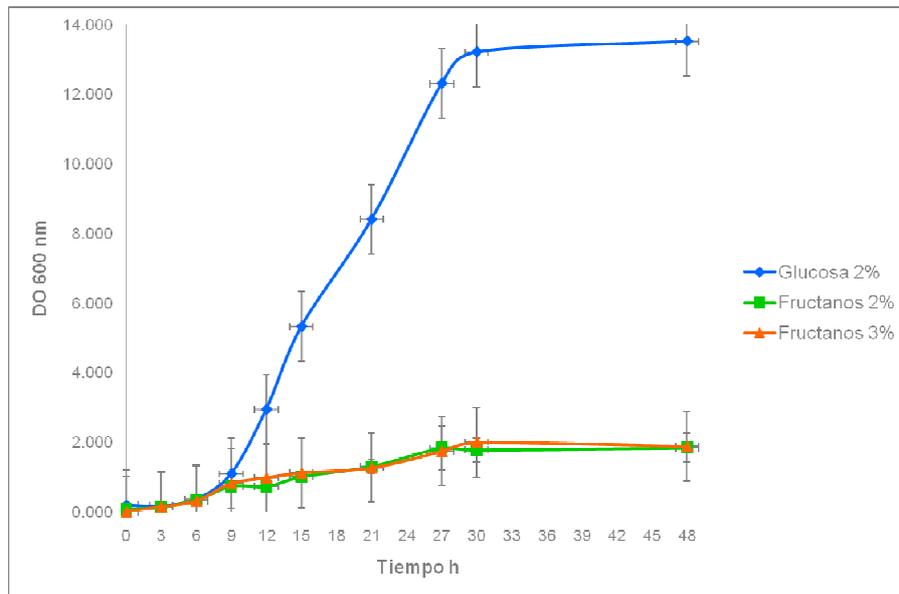
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cinética de crecimiento de *B. longum*

En la Figura 6 se presentan las curvas de crecimiento de *B. longum* en medio MRS suplementado con glucosa y con dos diferentes concentraciones de fructanos, 20 g/L y 30? g/L. Hasta las seis horas de crecimiento se mantuvieron en una fase lag de adaptación al mediosimilar, la diferencia en el crecimiento comenzó a las nueve horas, a este tiempo la fase exponencial de *B. longum* crecido en presencia de glucosa incrementa considerablemente, no así cuando crece con fructanos. Con base en el crecimiento se tomaron las muestras en la fase exponencial y en la fase estacionaria de 20 h y 36 h, respectivamente.

El perfil de crecimiento de *B. longum* en presencia de FOS es similar al reportado para *B. animalis* usando Raftilosa (Van der Meuler, 2004) y al obtenido para *B. adolescentis* usando transoligosacáridos (Van Laere et al., 2000) y al obtenido para *B. longum* usando fructanos de *Agave tequilana* (Martínez et al., 2007)

Como se puede observar en la Tabla 3, el crecimiento de *B. longum* es mayor en el medio, cuya principal fuente de carbono es glucosa. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de *B. longum* entre las concentraciones de FOS (20 g/L y 30 g/L), por lo que se utilizó la concentración de 20 g/L para los estudios posteriores.



de *B. longum* se
ntes de carbono:

En el medio suplementado con glucosa el crecimiento observado fue significativamente mayor al medio complementado con fructanos. El hábitat natural de *B. longum* es pobre en azúcares simples; se espera que las bifidobacterias sean capaces de utilizar los fructanos como principal fuente de carbono en el colon. Se observa un cambio en el comportamiento de crecimiento, dando como resultado en una disminución de la DO₆₀₀, pero puede darse un aumento en la cantidad de ácidos producidos. Se puede dar simplemente el mantenimiento de las células bajo esta condición.

Tabla 3. Crecimiento total de *B. longum* en las diferentes fuentes de carbono.

Medio	D.O. máxima
MRS Glucosa	13.213
MRS Fructanos 20 g/L	1.781
MRS Fructanos 30 g/L	1.998

7.2 Electroforesis Nativa azul (BN)

Al estandarizar el procedimiento para la obtención de los geles BN/SDS PAGE se encontró que el método más eficaz para una buena resolución de los patrones del complexoma fue el correr los geles de la primera y segunda dimensión utilizando la técnica de Schägger y Von Jagow (1975) . Se ha reportado que la electroforesis con buffer de Tricina-SDS-PAGE ofrece una mejor resolución de la segunda dimensión tras el Blu-Native PAGE (BN-PAGE) (Schägger 2006). También pudimos mejorar la separación de los complejos cuando cambiamos el tamaño de la cámara MiniVe de 10 x 8 cm a la cámara Ruby de 18 X 16 cm (Figura 7).

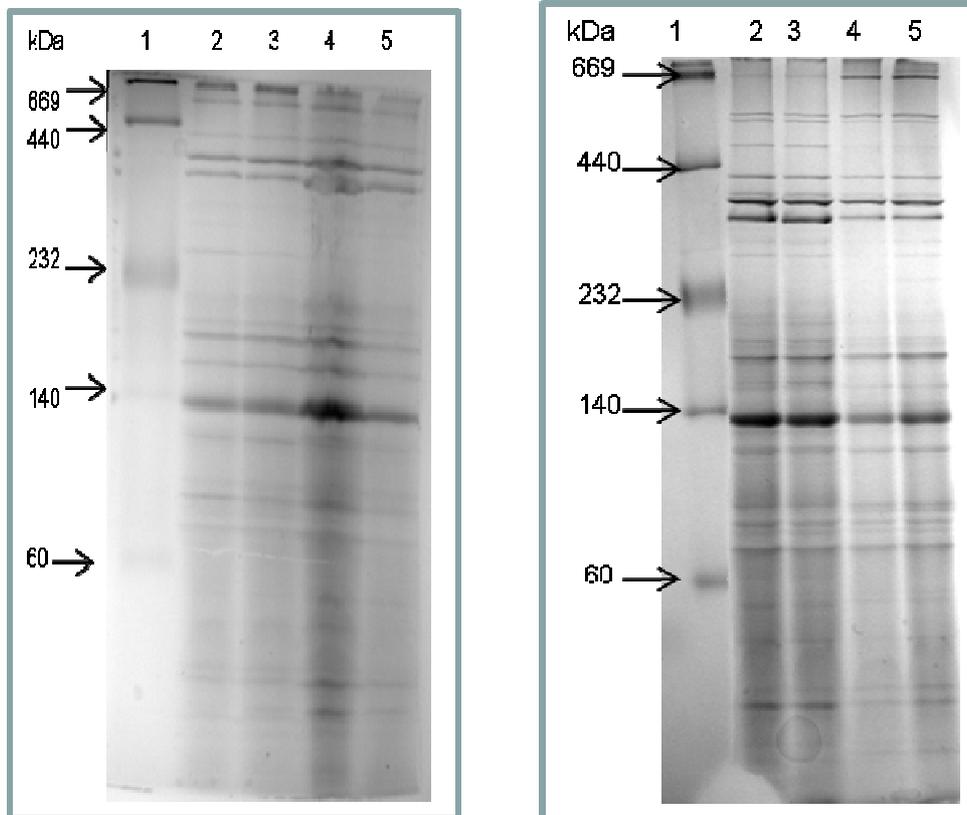
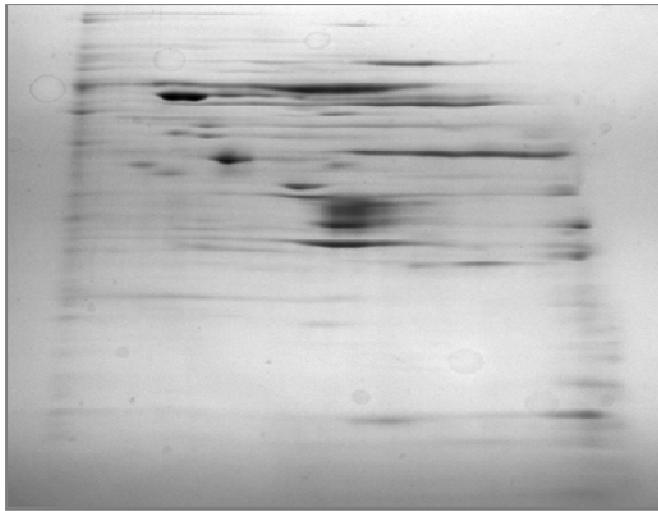


Figura 7. Comparación de BN-PAGE en dos cámaras de electroforesis. Los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie. A) Cámara miniVe, carril 1 MPM, carril 2 F36, carril 3 F20 Línea 4 G20, carril 5 G36 B) Cámara SE 600 Ruby. carril 1 MPM, carril 2 G20, carril 3 G36, carril 4 F20, carril 5 F36

Como se aprecia en la Figura 8, se obtuvo una mejor resolución de los spots (proteínas que conforman a los complejos) al utilizar el sistema Tris-Tricina en la electroforesis de la segunda dimensión.

7% → 16%



A)

7% → 16%



B)

A) Glicina SDS-
rió con un
e tiñeron con

Con base en lo anterior se decidió utilizar un gradiente de poliacrilamida para la primera dimensión de 7 a 16 % en el que se obtiene una buena definición de las bandas así como su correcta separación. Para la segunda dimensión se mantuvo una concentración de acrilamida constante de 8%. Tanto para la primera y segunda dimensión se utilizó para la electroforesis el buffer de tricina. Un gel representativo de la separación en estas condiciones se muestra en la Figura 9.

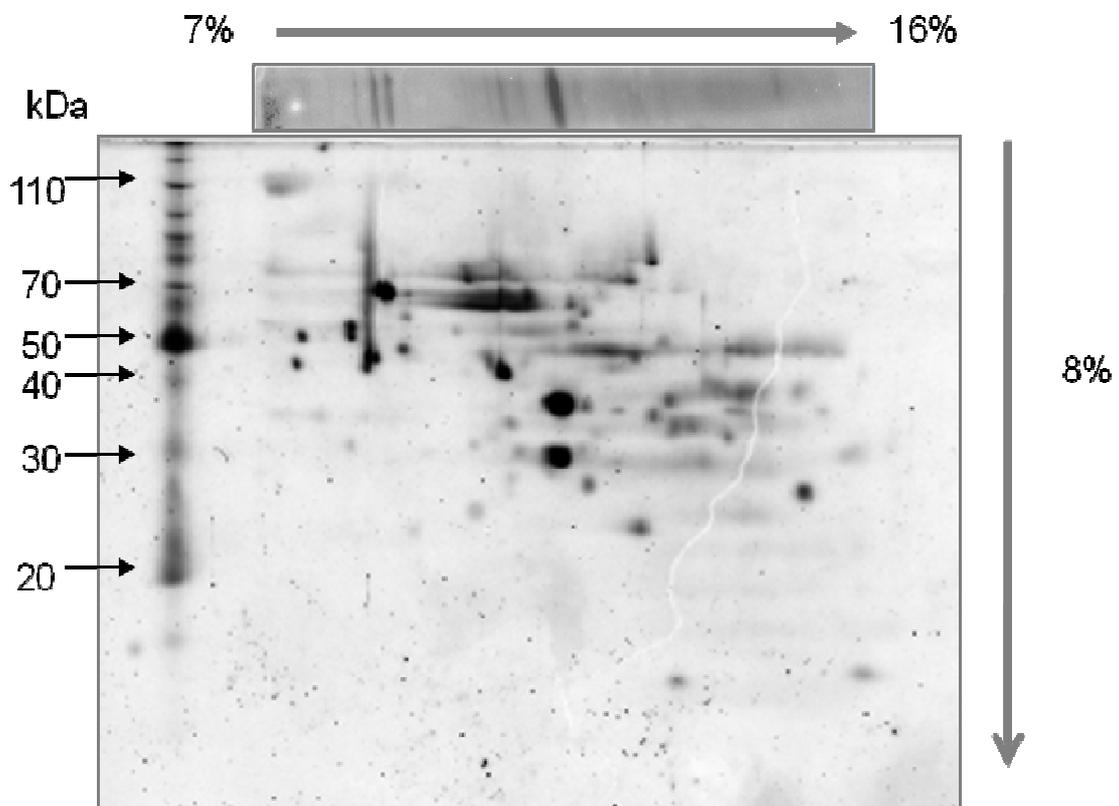


Figura 9. Complexoma de *Bifidobacterium longum* crecido en Glucosa como sustrato por 20 h a 37°. Primera dimensión gradiente de 7-16 % de acrilamida. Segunda dimensión gel de poliacrilamida al 8% para la. El gel fue teñido con Sypro ® Ruby

7.3 Complexoma de *B. longum*

Los complejos multiproteínicos fueron marcados como G para los geles obtenidos de *B. longum* crecidos con glucosa.

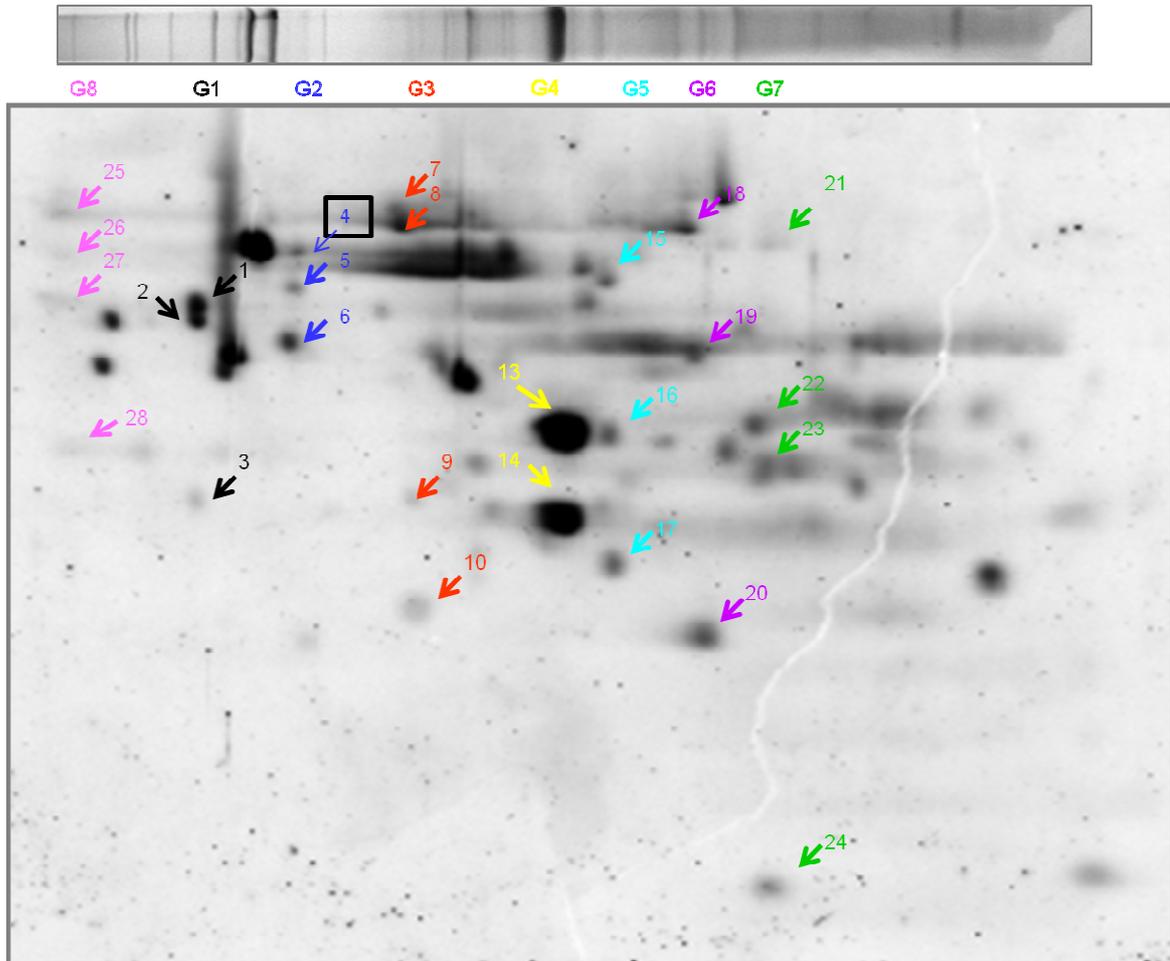


Figura 10. Perfil 2-D BN/SDS-PAGE de proteínas de complejos citosólicos de *B. longum* con Glucosa como fuente de carbono. Representación de los complejos hetero-multiméricos. Con flechas las flechas se señalan las proteínas que conforman un complejo, los números nos indican las proteínas a analizar por espectrometría de masas. Tinción Sypro® Ruby

Para los geles obtenidos de *B. longum* en los que se utilizó como fuente de carbono los Fructanos fueron nombrados como F. Las proteínas que co-migran en la primera dimensión y que son encontradas alineadas en una forma similar en la segunda dimensión son componentes de un complejo. Esta es una condición básica para la identificación de un complejo de multiproteínas (Pyndiah et al., 2007). El perfil de proteínas de los complejos separadas por 2D BN/SDS-PAGE de las dos fuentes de carbono utilizadas se muestra en las Figuras 10 y 11.

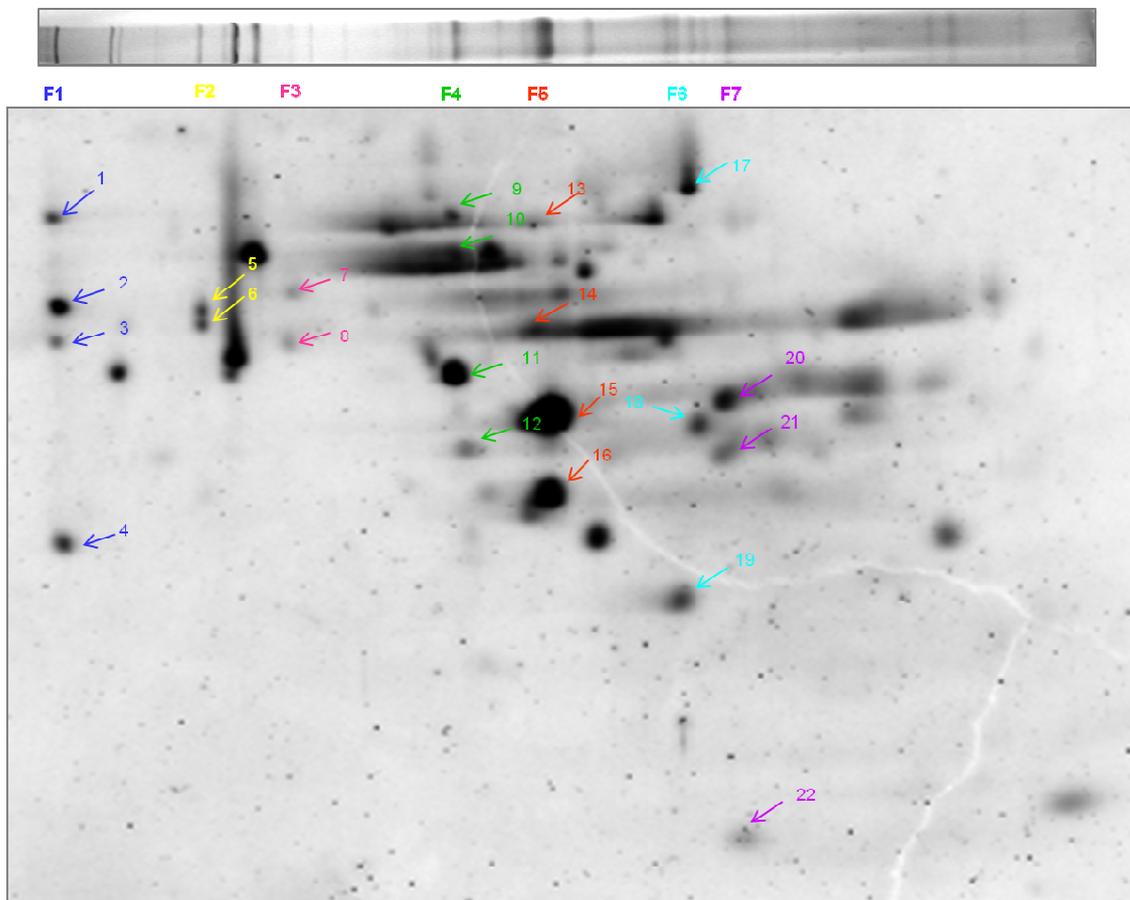


Figura 11. Perfil 2-D BN/SDS-PAGE de proteínas de complejos citosólicos de *B. longum* con Fructanos como fuente de carbono. Representación de los complejos hetero-multiméricos. Con flechas las flechas se señalan las proteínas que conforman un complejo, los números nos indican las proteínas a analizar por espectrometría de masas. Tinción Sypro® Ruby

Se obtuvieron 7 complejos citosólicos tanto de las muestras que contenían FOS como fuente de carbono, como para las muestras en las que se empleó glucosa. Se obtuvieron complejos similares entre las dos condiciones, como son F2 y G1, o ausentes en una condición, tal es el caso del complejo F3, que está conformado por una proteína más que en el complejo G2. También se ve disminuida la intensidad de las spots en el complejo G8 comparado con el complejo F1. El cambio en las proteínas observadas en la condición con fructanos puede deberse a que los prebióticos pueden provocar un cambio en la actividad enzimática microbiana. Por ejemplo: la actividad de β -galactosidasa y α -arabinopiranosidasa en *B. longum* se incrementa cuando el crecimiento tiene lugar en arabinogalactosa (Degman et al., 1195). Así mismo la inducción de enzimas que están involucradas en la degradación de carbohidratos puede ser reprimida por la presencia de glucosa.

7.4 Análisis de los geles

El análisis de los geles se realizó mediante el software Melanie V7.0, en el cual se pueden comparar los patrones de proteínas con base en la concordancia que se obtienen en ambos geles. Se observaron proteínas diferenciales en los geles de *B. longum* en las diferentes fuentes de carbono Figura 12.

El software realizó un análisis semicuantitativo basándose en la intensidad del punto (Figura 11), se utilizó el gel de *B. longum* en el que la fuente de carbono fue glucosa como control y el gel de FOS como problema. Se tomó el control como

referencia dándole el valor de 1, el aumento en el contenido de un punto se detecta si esta es el doble de intensa, para la disminución el contenido se detecta si el punto tiene la mitad de intensidad (0.5 o menos)

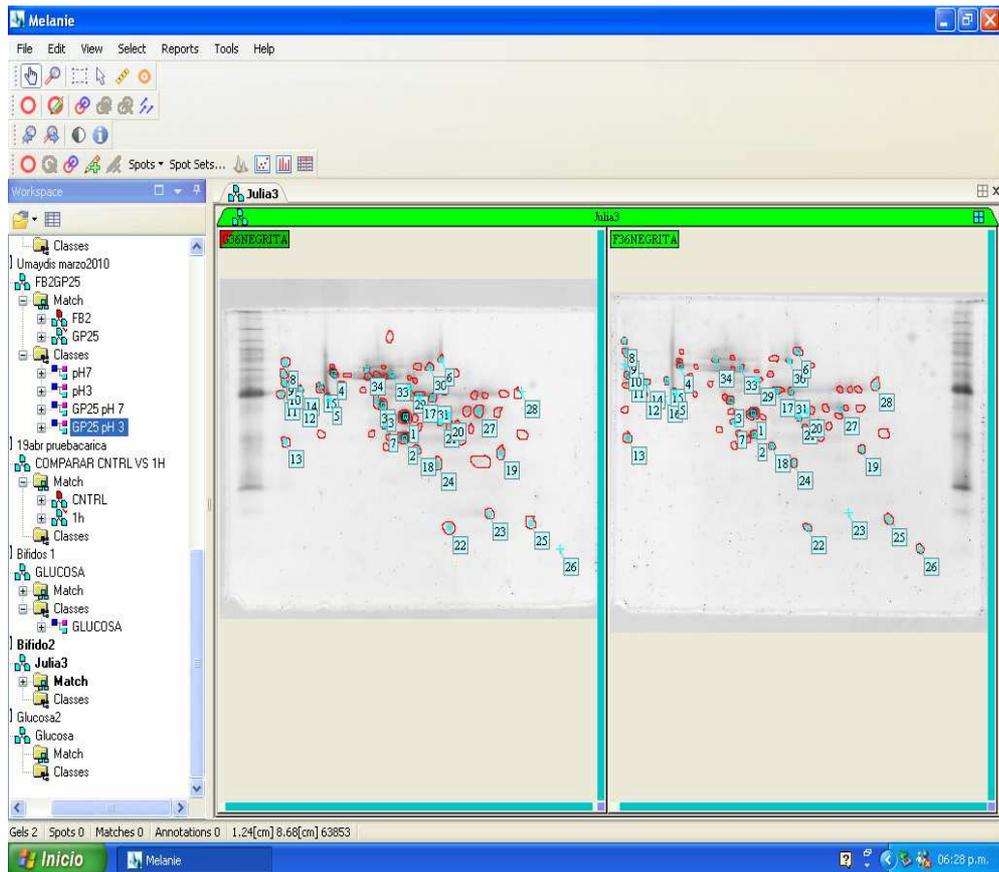


Figura 12. Análisis con el software Melanie. Geles de la fase estacionaria con glucosa y fructanos.

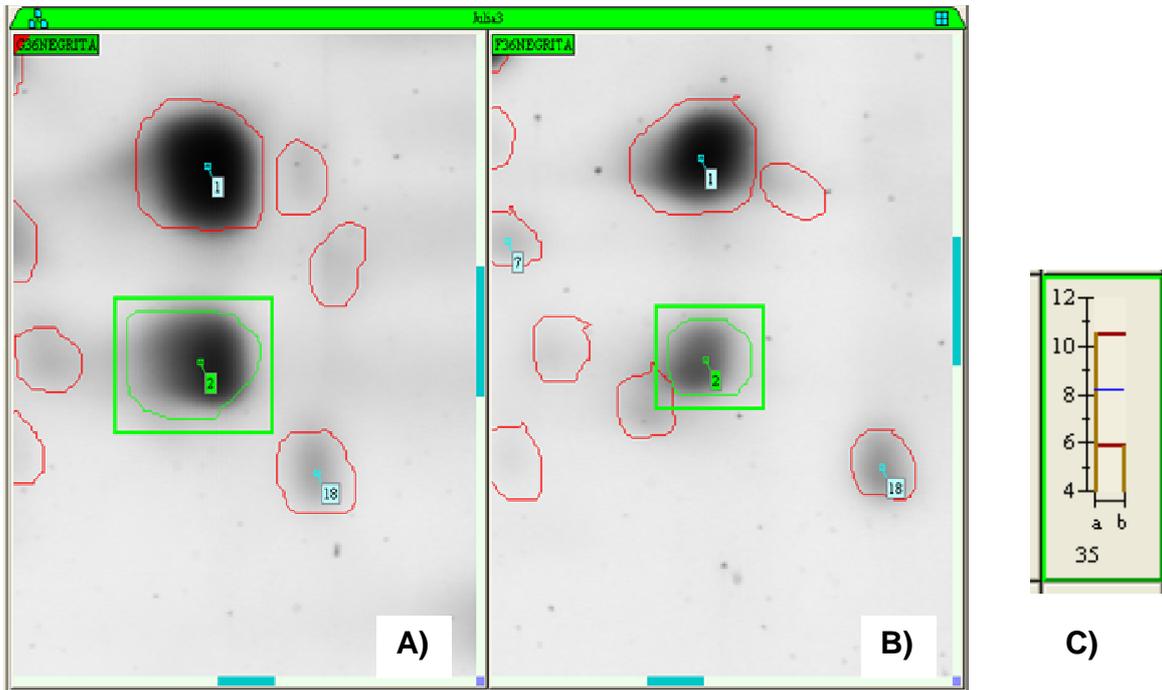


Figura 13. Análisis semicuantitativo de una mancha disminuida en intensidad. A) Glucosa B) Fructanos C) Relación de la intensidad de las manchas entre glucosa y fructanos

En el análisis semicuantitativo de las muestras en la fase exponencial se detectaron 55 spots de los cuales 25 se encontraban disminuidos, 7 aumentados y 23 iguales (Figura 14). Para las muestras tomadas en la fase estacionaria se detectaron 54 puntos: 19 proteínas aumentadas, 16 disminuidas y 19 iguales (Figura 15). En la fase exponencial la velocidad de crecimiento de las bacterias es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. En esta fase se da la multiplicación del microorganismos, por lo tanto las proteínas expresadas va aumentar debido a todos los procesos que se llevan a cabo.

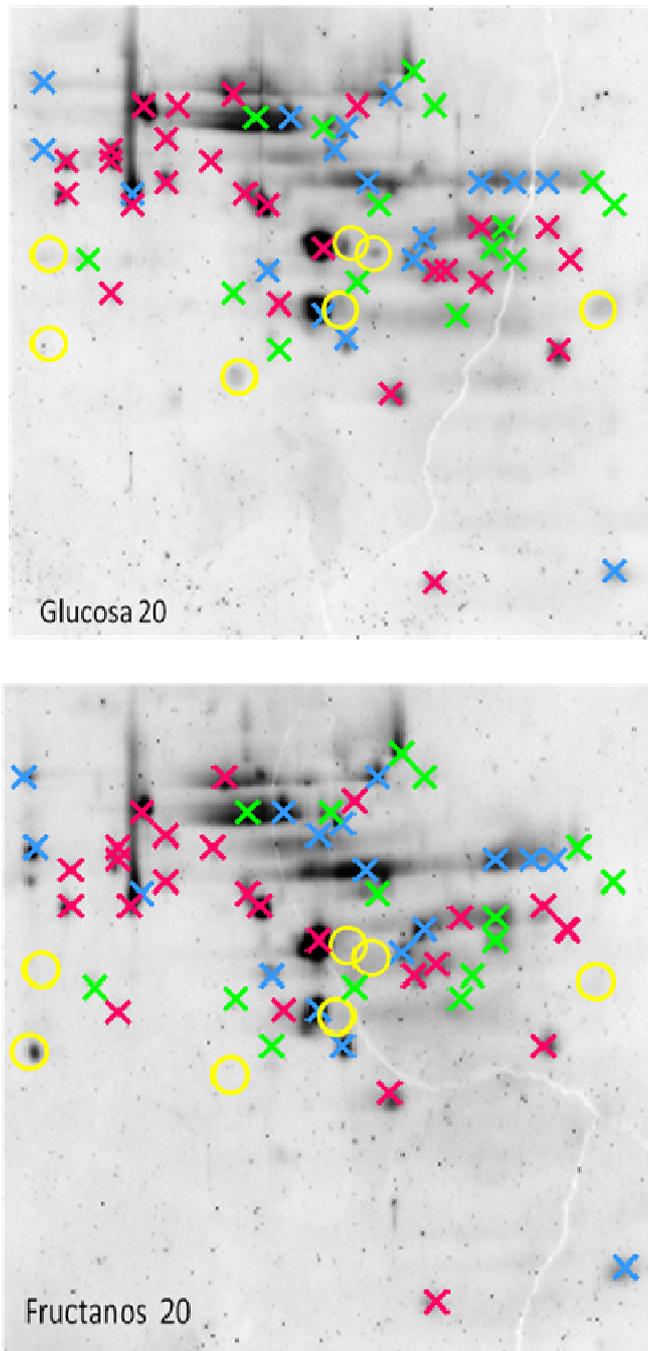


Figura 14. Análisis semicuantitativo de los geles bidimensionales de *B. longum* (Fase exponencial), usando distintas fuentes de carbono. A) Glucosa 20 g/L, B) Fructanos 20 g/L. Con x azules se muestran proteínas aumentadas, x rojas proteínas disminuidas en fructanos, los círculos amarillos muestran proteínas presentes en fructanos y ausentes en glucosa y las x verdes proteínas iguales. Tinción Sypro® Ruby

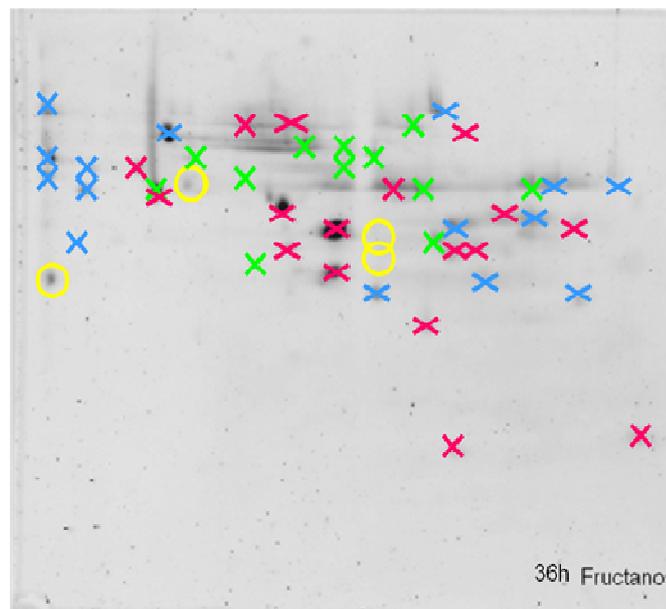
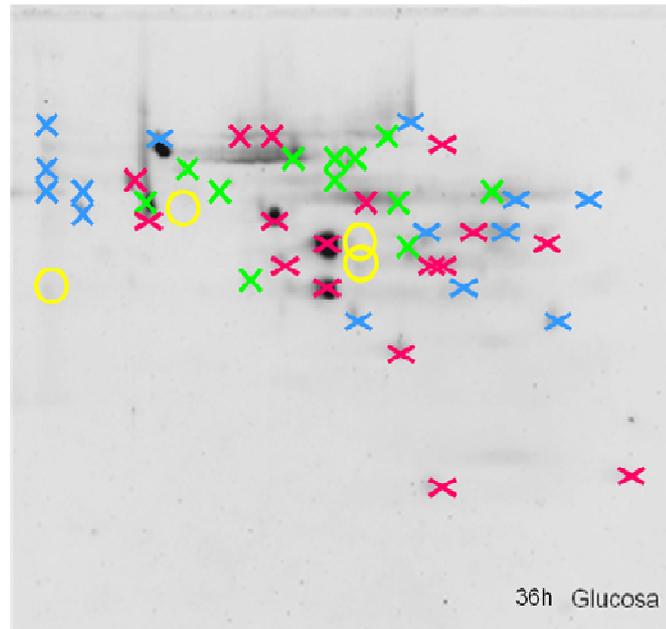


Figura 15. Análisis semi-cuantitativo de los geles bidimensionales de *B. longum* (Fase estacionaria). A) Glucosa 20 g/L, B) Fructanos 20 g/L. Con x azules se muestran proteínas aumentadas, x rojas proteínas disminuidas en fructanos, los círculos amarillos muestran proteínas presentes en fructanos y ausentes en glucosa y las x verdes proteínas iguales. Tinción Sypro® Ruby

VIII. CONCLUSIONES

El método de extracción de complejos totales en condiciones nativas para *B. longum*, muestran rendimientos aceptables y permite realizar geles BN-PAGE, para el análisis de las proteínas que conforman a los diferentes complejos.

La técnica de 2D BN/SDS-PAGE ofreció importantes posibilidades para el estudio del complexoma de *B. longum*, al usar dos fuentes de carbono, fructanos y glucosa. Permite estudiar las diferencias en los complejos aislados en diversas situaciones y también es útil para estudiar las interacciones de proteínas celulares de bacterias y eucariotas. Además de que se ve la interacción del total de las proteínas y no solo de una proteína aislada.

Los cambios observados en los geles bidimensionales muestran proteínas diferenciales, al usar fructanos como fuente de carbono. *B. longum* expresa diferentes proteínas dependiendo de la fuente de carbono.

Los resultados obtenidos en el trabajo realizado en maestría servirá de base para los estudios posteriores, se analizara completamente el complexoma de *B. longum* al usar glucosa y fructanos como fuente de carbono, además de identificar las proteínas diferenciales, que conforman los complejos.

IX. REFERENCIAS

- Aebersold R., Goodlett D. R. 2000. Mass Spectrometry in Proteomics. *Chemical Review*. 101, 269-295
- Anglade, P., Demey, E., Labas, V., Le Caer, J. P., Chich, J. F. 2000. Towards a proteomic map of *Lactococcus lactis* NCDO 763. *Electrophoresis* 21, 2546–2549.
- Axelsson L. 1998. Bifidobacteria and probiotic action. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, eds. S. Salminen and A. Von Wright. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, p. 519-587.
- Ballabriga A. 2001. Nutrición en la infancia y en la adolescencia, 2ª Edición, Ediciones ERGON, 625-650.
- Ballongue J. 1998. Bifidobacteria and probiotic action. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and functional Aspects*, eds. S. Salminen and A. von Wright, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, p. 519-587.
- Banguela A., Hernández L. 2006. Fructanos: from natural sources to transgenic plantas. *Bioteología Aplicada*; 2,:202-210
- Biavanti B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50, 117-131.
- Buddington R.K., Williams C.H., Chen S., Witherly S.A. 1996. Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *Am J Clin Nutr*; 63, 709–16.

- Camacho C. m., Wollscheid B., Aebersold R., Steimle V., Schamel W., 2004. Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multi-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates. *Molecular & Cellular Proteomics*; 3, 176–182.
- Degnan, B. A., Macfarlane, G. T. 1995, Arabinogalactan utilization in continuous cultures of *Bifidobacterium longum*, Effect of co-culture with *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Anaerobe*, 1, 103–112.
- Embley, T. M. y Stackebrandt, E. (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 48, 257–289.
- Ferrer L. B., Dalmau S.J. 2001 Alimentos funcionales: probióticos; *Acta Pediatr Esp*; 59, 150-155
- Ishibashi N., Yamazaki S. 2001. Probiotics and safety, *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 465S–470S.
- Erickson K. L., Hubbard N. E., 2000. Probiotic Immunomodulation in Health and Disease. *J. of Nutrition*, 130: 403S–409S
- FAO/WHO, 2001, Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food. Disponible en http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf
- Fuller, R. 1989 Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66, 365–378.
- Gallaher D. D., Khil J., 1999. The Effect of Synbiotics on Colon Carcinogenesis in Rats, *J. Nutr*, 129, 1483S-1487S.
- Gibson G. R., Roberfroid M. 1994. Dietary modulation of human colonic microbiota: including the concept of prebiotics, *J Nutrition*, 125, 1401-1412.

- Graves P.R., Haystead T.A.J. 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics, microbiology and Molecular Biology Reviews, vol 66 No 1, 39-63.
- Lasserre J. P., Beyne E., Pyndiah S., Lapailierie D., Claverol S., Bonneu M. 2006. A complexomic study of *Escherichia coli* using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*; 27, 3306–3321
- Leahy S., Higgins D., Fitzgerald G., Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria, *J. Appl. Microbiol*, 98, 1303-1315.
- Lieving V., Peiffer I., Hudault S., Rochat F., Brassart D., Neeser J., Servin A. 2000. Bifidobacterium strain from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity, *Gut*, 47, 646-652.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H. 1965 Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147, 747–748.
- Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansku C. 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharmacol. Ther*, 22, 495-512.
- Pickering L.K., Granoff D.M., Erickson J.R . 1998, Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics*; 101, 242-249.
- Pyndiah S., Lasserre J.P., Ménard A., Claverol S., Prouzet-Mauléon V., Mégraud F., Zerbib F., y Bonneu M. 2007. Two-dimensional Blue

Native/SDS Gel Electrophoresis of Multiprotein Complexes from *Helicobacter pylori*. Molecular

o & Cellular Proteomics; 6,193–206.

- Reisinger V., Eichacker L. A. 2008. Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE Journal of Proteomics; 71,277-283.
- Reuter G. 1963. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings und Erwachsenenstuhl. Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung-1, 191: 486-507.
- Ritsema T., Smeeckens S. 2003. Fructans beneficial for plants and humans, Current Opinion in Plant Biology, 6, 223-230.
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics: The concept revisited, J. Nutrition. 137, 830S-837S.
- Rowland I.R., Rumney C. J., Coutts J. T., Lievense L. C. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis; 19 :2, 281–285, 1998
- Scardovi V., Sgorbati B. y Zani, G. 1971 Starch gel electrophoresis of fructose 6 phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*. J. of Bacteriology 106, 036-1039.
- Scardovi V. y Trovatelli L.D. 1965. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. Annali di Microbiologia ed Enzymologie 15, 19-29.

- Schell M. A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M. C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R. D., Arigoni, F. 2002 The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14422–14427.
- Stouthamer A. H., Vries W. 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J. Bacteriol*, 93, 574-576.
- Vijn I., Smeekens S. 1999, Fructan: more Than Reserve Carbohydrate, *Plant Physiology*, 120, 351-359.
- Vestal M. L. 2001. Methods of Ion Generation, *Chemical Review*, 101, 361-375.
- Vestal M., Juhasz P. 1998, Resolution and mass accuracy in matrixassisted laser desorption ionization- time-of-flight, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 9, 892–911.
- Vitali B., Wasinger V., Brigidi P., Guilhaus M. 2005. A Proteomic view of *Bifidobacterium infantis* generated by multi-dimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Proteomics*, 5, 1859-1867.

X. APÉNDICE

A. Composición medio MRS

Componente	Cantidad*
Peptona	1 g
Extracto de res	1g
Extracto de levadura	0.5 g
Tween 80	0.1 g
Citrato de amonio	0.2 g
Acetato de sodio	0.5 g
MgSO ₄	0.01 g
MnSO ₄	0.005 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
Cisteína	0.05 g
Glucosa**	2 g

* Cantidades para un volumen final de 100 mL

** En el caso de fructanos se uso 2 y 3 g

B. Buffer de muestra*

	Concentración final	Cantidad
Ácido amino caprónico	750 mM	1.968 g
Bis Tris pH 7.0	50 mM	¿?
EDTA-Na ₂	0.5 mM	¿?
PMSF**	1 mM	¿?

**PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) es añadido justo antes de su uso

*Almacenar a 4 °C

*Almacenar en alícuotas de 2 mL a -20 °C

C. Stock de Azul de bromofenol

	Concentración final	Cantidad
Azul de bromofenol	1%	50 µL
Tris-base	50 mM	60 mg
H ₂ O MilliQ		a 25 mL

D. Buffer de cátodo sin color BN 10X

	Concentración final	cantidad
Tricina	500 mM	89.60g
Bis-Tris	150 mM	31.38 g
pH 7.0 ajustar con HCL concentrado		
Agua MilliQ		A 1L

E. Buffer de cátodo azul. 1X

	Concentración Final	cantidad
Coomassie 250 G	0.02% (w/v)	0.1 g
Buffer de cátodo sin color BN		50 mL
Agua MiliQ		A 500 mL

F. Buffer de ánodo BN 10X

	Concentración final	cantidad
Bis-Tris	500 mM	52.3 g
pH 7 ajustar con HCL concentrado		
Agua MilliQ		A 500 mL

G. Buffer de Gel BN 6X no está citado en el texto, sería bueno describir como se preparó el gel nativo

	Concentración final	cantidad
Ácido amino capróico	3 M	39.36 g
Bis-Tris	0.3 M	3.12 g
Agua MilliQ		A 100 mL

H. Persulfato de amonio 10 %

	Concentración final	cantidad
Persulfato de amonio	10%	0.1 g
Agua MilliQ		A 1.0 mL

I. Gel de gradiente BN miniVe

Componente	Cantidad 16%	Cantidad 7%	Cantidad 4%
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	1.866 mL	0.8166 mL	0.533 mL
Buffer BN 6X	0.569 mL	0.569 mL	0.66 mL
Glicerol	0.654 mL	-----	-----
H ₂ O	0.411 mL	2.114 mL	2.8 mL
Vol. Final	3.5 mL	3.5 mL	4mL
PSA	11.3 µL	15.1 µL	17.4 µL
TEMED	1.13 µL	1.51 µL	1.74 µL

J. Gel de gradiente BN Ruby

Componente	Cantidad 16%	Cantidad 7%	Cantidad 4%
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	4.0 mL	2.09 mL	0.933 mL
Buffer BN 6X	1.46 mL	1.46 mL	1.165 mL
Glicerol	1.68 mL	-----	-----
H ₂ O	1.06 mL	5.44 mL	4.9 mL
Vol. Final	9.0 mL	9.0 mL	7.0 mL
PSA	29.01 µL	38.75 µL	30.45 µL
TEMED	2.901 µL	3.875 µL	3.45

K. Buffer de solubilización BN

	Concentración final	cantidad
SDS (w/v)	2%	2g
Na ₂ CO ₃	66 mM	0.7067 g
β-Mercaptoetanol	2%	2 mL
Agua MilliQ		A 20 mL

L. Buffer de ánodo Tricina-SDS-PAGE 10X

	Concentración final	cantidad
Tris	1 M	121.12 g
HCl	0.225 M	6.84 mL
pH 8.9		
Agua MilliQ		A 1L

M. Buffer de cátodo Tricina-SDS-PAGE 10X

	Concentración final	cantidad
Tris	1 M	121.12 g
Tricina	1M	179.17 g
SDS	1%	10 g
pH ~ 8.25		
Agua MillQ		A 1L

N. Buffer de Gel 3X

	Concentración final	cantidad
Tris	3 M	72.66 g
HCl	1M	6.08 mL
SDS	0.3%	0.6 g
pH 8.45		
Agua MillQ		A 200 mL

O. Gel desnaturalizante de poliacrilamida 8% (Tricina)

Componente	Cantidad 8%	Cantidad 4%
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	16 mL	2 mL
Buffer de gel 3X	19.99 mL	3.75 mL
Urea	21.6 g	-----
H ₂ O	Añadir para ajustar a vol. final	9.25 mL
Vol. Final	60 mL	15 mL
PSA	99.84 µL	112.5 µL
TEMED	9.984 µL	11.25 µL

P. Agarosa al 5%

	Concentración final	Cantidad
Buffer de ánodo		100 mL
Agarosa	0.5%	0.5 g
Azul de bromofenol	0.002 %	200 µL

Q. SDS 10 %

	Concentración final	Cantidad
SDS	10 % (p/v)	5.0 g
H ₂ O MilliQ	0.5%	50 mL

R. SDS buffer de electroforesis Glicina

	Concentración final	Cantidad
Tris-base	25 mM	30.3 g
Glicina	192 mM	144.0 g
SDS	0.1 % (p/v)	10.0 g

S. Gel desnaturalizante de poliacrilamida Glicina 8%

Componente	Cantidad 8%	Cantidad 4%
Urea	3.708 g	-----
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	8.8 mL	0.64 mL
Buffer de Gel SDS 8X/ 2X	1.92 mL	1.98 mL
H ₂ O	18.572 mL	1.276 mL
Vol. Final	33 mL	3.9 mL
PSA	15.07 µL	26.66 µL
TEMED	73.87 µL	2.66 µL

T. Buffer de Gel SDS 8X

	Concentración final	Cantidad
Tris	3 M	18.174 g
pH 8.8		
Agua MillQ		50 mL

U. Buffer de Gel SDS 2X

	Concentración final	Cantidad
Tris	0.25 M	0.757 g
pH 6.8		
Azul de Bromofenol	0.002%	15 µL (Stock 2%)

V. Buffer de corrida 10X

	Concentración final	Cantidad
Tris	0.25 M	0.757 g
Glicina	1.92 M	
SDS	1% (p/v)	15 μ L (Stock 2%)
pH 8.4 ajustado automaticamente		
Agua MilliQ		25 mL