



IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis proteómico de *Bifidobacterium longum*
en presencia de fructanos de *Agave tequilana*
como fuente de carbono**

Tesis que presenta

José Luis Martínez Salgado

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2007



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Análisis proteómico de *Bifidobacterium longum* en presencia de fructanos de *Agave tequilana* como fuente de carbono**" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Luis Martínez Salgado** y aprobada el **11 de 07 de 2007** 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
Presidente

Dr. Antonio De León Rodríguez
Secretario

Dra. Maria de Lourdes Reyes Escogido
Vocal



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 203335 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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 038 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2007, 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. Ana Paulina Barba De la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Secretario	IPICYT
Dra. María de Lourdes Reyes Escogido	Sinodal externo	UNAM

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José Luis Martínez Salgado

sobre la Tesis intitulada:

Análisis Proteómico de Bifidobacterium longum en Presencia de Fructanos de Agave tequilana como Fuente de Carbono

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes julio de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Martín
Secretario Académico



Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por abrirme las puertas de su laboratorio, su tiempo y dedicación.

Al Dr. Antonio De León Rodríguez por sus opiniones y correcciones a este trabajo.

A la Dra. María de Lourdes Reyes Escogido que me instruyo y con mucha paciencia.

A la M.C. Erika Patricia Briones Cerecero por su amistad y apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio 2.

Al M.C. Leonardo Chávez Guerrero por su apoyo en el manejo de la microscopia

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PAG.
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
I. RESUMEN	1
II. ABSTRAC	2
III. INTRODUCCION	3
3.1 Bifidobacterias	3
3.2 Probióticos	4
3.2 <i>Bifidobacterium longum</i>	5
3.3 Prebióticos	6
3.4 Fructanos	7
3.5 Plantas del género <i>Agave</i> como fuente de prebióticos	9
3.6 Simbióticos	10
3.7 Proteómica	11
3.7.1 Caracterización de proteínas	13
3.8 Microscopia de Fuerza Atómica	14
IV. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo General	16
4.2 Objetivos Específicos	16
V. MATERIALES Y METODOS	17
5.1 Microorganismo y medio	17
5.2 Condiciones de cultivo	17
5.3 Microscopia de fuerza atómica	17
5.4 Análisis estadístico	17
5.5 Preparación del extracto proteico celular	18
5.6 Cuantificación de proteínas	18
5.7 Electroforesis bidimensional	19

5.7.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoco	19
5.7.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE	20
5.8 Tinción	21
5.9 Análisis de los geles	21
5.10 Identificación de proteínas	21
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1 Utilización de fructanos como fuente de carbono	22
6.2 Cambios morfológicos	23
6.3 Electroforesis bidimensional	27
6.4 Análisis de los geles	29
6.4.1 Análisis en medio mínimo	31
6.5 Espectrometría de masas	31
VIII. CONCLUSIONES	38
IX. REFERENCIAS	39
X. APENDICES	46

ÍNDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla 1. Efecto prebiótico de varios oligosacáridos	7
Tabla 2. Preparación de la curva de calibración para el análisis de bradford	18
Tabla 3. Programación del equipo Ettan IPGphor	20
Tabla 4. Crecimiento máximo de <i>B. longum</i> en los diferentes medios	23
Tabla 5. Proteínas seleccionadas de <i>B. longum</i> identificadas por MASCOT	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1. <i>Bifidobacterium longum</i> en intestino humano.	3
Figura 2. Principales estructuras de fructanos.	8
Figura 3. Estructura propuesta para los fructanos presentes en <i>Agave tequilana</i> .	10
Figura 4. Ejemplificación de un gel bidimensional de poliacrilamida.	12
Figura 5. Estrategia para la identificación de una proteína mediante mapeo peptídico.	14
Figura 6. Esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica.	15
Figura 7. Equipo Ettan IPGphor II y sus partes.	20
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>B. longum</i> en diferentes fuentes de carbono.	22
Figura 9. Análisis dimensional de las imágenes obtenidas por microscopia de fuerza atómica	24
Figura 10. Comparación de las dimensiones de <i>B. longum</i> en diferente fuente de carbono	25
Figura 11. Morfología microscópica de <i>Bifidobacterium longum</i> .	26
Figura 12. Comparación de los métodos de extracción de proteínas.	27
Figura 13. Gel de poliacrilamida al 12%. utilizando tiras de 7 cm con rango de pH 3 – 10.	28
Figura 14. Gel de poliacrilamida al 12% utilizando tiras de 13 cm con rango de pH 4 – 7.	28
Figura 15. Vista multicanal de los geles bidimensionales de <i>B. longum</i> .	29
Figura 16. Análisis semicuantitativo de una mancha aumentada en intensidad.	30

Figura 17. Análisis semicuantitativo de los geles bidimensionales de <i>B. longum</i> usando distintas fuentes de carbono.	30
Figura 18. Patrones bidimensionales de <i>B. longum</i> en medio mínimo.	31
Figura 19. Imagen patrón obtenida por PDQuest.	32
Figura 20. Resultado obtenido de la base de datos Mascot a partir de uno de los datos obtenidos por espectrometría de masas de <i>B. longum</i> .	33
Figura 21. Vías del catabolismo de carbohidratos en <i>Bifidobacterium longum</i>	35
Figura 22. Grupos de genes para utilización de oligosacáridos	36

I. RESUMEN

Bifidobacterium longum es una de las especies bacterianas nativas de la flora intestinal, conocida como probióticas; es decir bacterias que proporciona beneficios a la salud del huésped. En el intestino los probióticos consumen preferencialmente azúcares no digeribles por el huésped como los fructanos que se encuentran en plantas y son conocidos como prebióticos. El reciente interés de la industria tequilera de darle nuevos usos a los fructanos de *Agave*, despierta el interés de evaluar sus propiedades prebióticas. En el presente trabajo hemos evaluado la capacidad de *Bifidobacterium longum* para utilizar fructanos de *Agave tequilana* como fuente de carbono. El crecimiento de *B. longum* usando glucosa es similar al de fructanos como fuentes de carbono; por otra parte, en el estudio de microscopia de fuerza atómica se observó que las dimensiones de bifidobacterium son mayores cuando se crece con el prebiótico, reflejando una adaptación del microorganismo a la fuente de carbono. Los cambios de expresión de proteínas de bifidobacterium al crecer en medio con fructanos fueron analizados por 2D-PAGE. Las proteínas diferenciales fueron caracterizadas por MALDI-TOF y del análisis bioinformático de los datos de masas, se encontraron cambios en proteínas transportadoras de carbohidratos del tipo ABC y varias enzimas del catabolismo de carbohidratos como la vía de las pentosas, glucólisis y la vía de la F6PPK. La información generada nos da la pauta a realizar una búsqueda más exhaustiva de elementos involucrados en el catabolismo de fructanos en bacterias probióticas, y la relación con sus cualidades prebióticas. Hemos demostrado que *Bifidobacterium longum* es capaz de utilizar inulina de *Agave tequilana* como fuente de carbono y de ahí la capacidad de este carbohidrato para la formulación de novedosos prebióticos por la industria alimentaría.

II. ABSTRACT

Bifidobacterium longum is one of the bacterial species found in gastrointestinal tract that it has probiotic properties, that is to say, provides benefits to the health of the host. In the intestine they preferentially consume nondigeribles sugars by the host like the fructanos that are found in plants and are know like prebiotics. The recent interest of tequila industry to give new uses to agave fructanos, wakes up the interest to evaluate its prebiotics properties. In this work we have evaluated the capacity of *Bifidobacterium longum* to use fructans from *Agave tequilana* like carbon source. The growth of *Bifidobacterium longum* using glucose is similar to the fructanos like carbon sources; on the other hand, in the study of microscopy of atomic force it was observed that the dimensions of bifidobacterium are greater when it use the prebiotic, reflecting the adaptation of the microorganism to the carbon source. The changes of protein expression of bifidobacterium when growing in medium with fructanos were analyzed by 2D-PAGE. The proteins differentials were characterized by MALDI-TOF and with the bioinformatics analysis of the date, we found changes in proteins ABC type carbohydrates transporters and several enzymes of the carbohydrate catabolism like the pentoses pathway, glycolysis and the F6PPK pathway. Based on information generated in this work, it becomes necessary a more exhaustive research of elements involved on fructans catabolism in probiotic bacter, and its relationship with its prebiotic qualities. We have demonstrated that *Bifidobacterium longum* is able to use *Agave tequilana*'s fructans like carbon source and of there the capacity of this carbohydrate for the formulation of novel prebiotics foods by industry.

III. INTRODUCCION

3.1 Bifidobacterias

Las bifidobacterias fueron aisladas en las heces de niños alimentados con leche materna y descritas como bacterias alargadas irregulares por Henry Tissier, en 1900. Estas bacterias Gram positivas, no productoras de gas, anaerobias con morfología bifurcada (Figura 1); fueron originalmente llamadas *Bacillus bifidus* e inicialmente fueron consideradas como una bacterias ácido lácticas (Axelsson, 1998). La primera referencia de bifidobacterias fue realizada en 1924 por Orla Jensen, quien propuso el género *Bifidobacterium* (Leahy *et al.*, 2005).

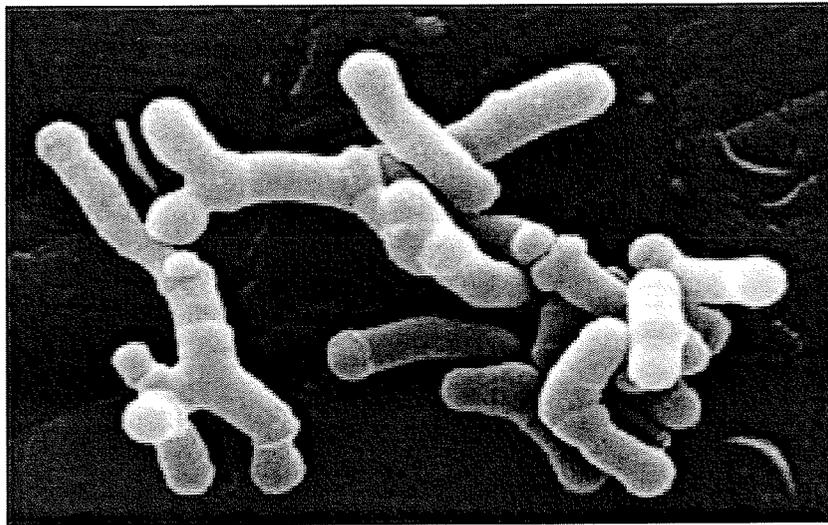


Figura 1. *Bifidobacterium longum* en intestino humano.
(tomado de www.genomenewsnetwork.org)

Hasta la década de los 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).

En 1967, se detectó una ruta única para el metabolismo de la glucosa en bifidobacterias, mediante la enzima fructosa 6-fosfato fosfoacetolasa (F6PPK), esto proporcionó una clara distinción de las especies y finalmente las diferenció para aparecer en el Manual de Bergey (Ballongue, 1998).

Las bifidobacterias se encuentran comunmente en el colon de los mamíferos. De las 34 especies conocidas actualmente 13 fueron aisladas de humanos (Leahy *et al.*, 2005). Las especies predominantes en el humano son *B. breve* y *B. infantis* en niños, y *B. adolescentis* y *B. longum* en adultos (Hopkins *et al.*, 1998). Se ha descrito que la morfología bacterial varía dependiendo del medio de cultivo; principalmente se encuentran como bastones, sin embargo pueden ser redondas, bifurcadas o pleomórficas (Klijn *et al.*, 2005; Ballongue, 1998). Las bifidobacterias producen principalmente ácido láctico y ácido acético al metabolizar glucosa usando la F6PPK, la transaldolasa y la transcetolasa (Fandi *et al.*, 2001).

3.2 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos, los cuales administrados en adecuadas cantidades confieren beneficios a la salud del huésped. (FAO/WHO, 2001).

Las bifidobacterias afectan la eco-fisiología de la microbiota intestinal y también interactúan directamente con el metabolismo del huésped. Las bacterias son capaces de adherirse al colon y pueden influenciar la composición de la mucosa. Esta colonización incrementa la resistencia a infecciones por patógenos (Ballongue, 1998).

Algunos miembros del género *Bifidobacterium* se utilizan en alimentos como probióticos. Los efectos nutricionales causados por las bifidobacterias incluyen la producción de vitaminas y ácido láctico. El mejoramiento de intolerancia a lactosa, hipercolesterolemia y ácidos biliares son considerados como resultado del metabolismo de las bifidobacterias en el colon. Las bifidobacterias también muestran poseer actividad anticarcinogénica e inmunoestimuladora (Leahy *et al.*, 2005; Arunachalam *et al.*, 2000 ; Ballongue, 1998).

3.2 *Bifidobacterium longum*

Bifidobacterium longum fue reportada por primera vez en 1963 (Reuter, 1963). Se encuentra en el colon de humanos de todos los grupos de edad familiarmente es cercano a *B. infantis*. La distinción de las diferentes especies de *Bifidobacterium* se hace en base a su capacidad para fermentar distintos azúcares. *B. longum* es la única especie de *Bifidobacterium* capaz de fermentar el trisacárido melezitosa y la arabinosa. La mayoría de los estudios de efectos a la salud de los probióticos han sido realizados con *B. longum* (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 (Lievin *et al.*, 2000) e incluso ayuda al organismo huésped a resistir infecciones por bacterias patógenas como *E. coli* O157 (Ishibashi y Yamazaki, 2001) y *Salmonella typhimurium* (Leahy *et al.*, 2005). Otros estudios han mostrado que *B. longum* inhibe la inducción del cáncer de colon en ratas (Picard *et al.*, 2005; Gallaher y Khil, 1999). También se ha mostrado una acción efectiva contra tumores de hígado, focos aberrantes en las criptas y diarrea asociada a antibióticos (Leahy *et al.*, 2005; Picard *et al.*, 2005; Ballongue, 1998).

La persistencia de *B. longum* en el colon puede ser resultado de su capacidad para catabolizar sustratos, que son pobremente digeridos por el huésped o por otros microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal, 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 ileon, implicando que estos carbohidratos complejos son degradados y utilizados en el colon (Schell *et al.*, 2002).

El genoma de *B. longum* NCC2705 ha sido reportado (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Protein%20Table&list_uids=254), observándose que posee un gran número de genes relacionados con el metabolismo de oligosacáridos, éstos comprenden más del 8% del genoma, cuenta con más de 40 proteínas con actividad de

glicosilhidrolasas. En base a identidad de secuencia de aminoácidos se ha predicho la actividad de dos xilanasas, nueve arabinosidasas, dos α -galactosidasas, neopullanasa, isomaltasa, maltasa, inulinasa (β -fructofuranosidasa), cuatro β -galactosidasas, tres β -glucosidasas, tres hexosaminidasas, y tres α -manosidasas (Schell *et al.*, 2002).

3.3 Prebióticos

Los prebióticos pueden definirse como ingredientes no digeribles que afectan benéficamente al huésped, a través de una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un grupo limitado de bacterias del colon, que pueden mejorar la salud del huésped (Gibson y Roberfroid, 1994). Desde la introducción de este concepto los prebióticos han despertado el interés científico e industrial.

La clave del prebiótico reside en ser un ingrediente capaz de resistir los ácidos gástricos, la hidrólisis enzimática y la absorción intestinal, esto no significa que necesariamente sea completamente indigestible, pero sí garantiza que una cantidad significativa esté disponible para ser fermentado por la microflora intestinal, permitiendo cambios específicos en la composición y/o actividad de las bacterias intestinales lo que les confiere ventajas sobre otras bacterias patógenas y por lo tanto también se beneficiara la salud del huésped (Roberfroid, 2007).

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

Los actuales sistemas de producción de fructanos son la extracción de inulina de la raíz de achicoria y la conversión industrial de la sacarosa en fructooligosacáridos con el empleo de enzimas de hongos (Banguela, 2006).

Tabla 1. Efecto prebiótico de varios oligosacáridos

Carbohidrato	Indigestibilidad	Fermentación	Selectividad	Prebiótico
Inulina y oligofruetosa	Si	Si	Si	Si
Galactooligosacáridos	Posible	???	Si	Si
Lactulosa	Posible	???	Si	Si
Isomaltooligosacáridos	Parcial	Si	Promete	No
Lactosacárosa	ND	ND	Promete	No
Xilooligosacáridos	ND	ND	Promete	No
Oligosacáridos de soya	ND	ND	ND	No
Glucooligosacáridos	ND	ND	ND	No

ND, No determinado; ???, datos preliminares que requieren investigación
(Adaptada de Roberfroid, 2007)

3.4 Fructanos

Los prebióticos que más se han estudiado son los $\beta(2-1)$ fructanos que son polímeros de fructosas lineales y ramificados. Estos carbohidratos se encuentran en un 15% del reino vegetal, se sintetizan a partir de la sacarosa por la acción de dos o más fructosiltransferasas. Los fructanos de las plantas presentan diferencias en las estructuras y longitud de su cadena (Figura 2).

El fructano linear más simple es la inulina, la cual consiste en residuos de fructosil unidos por enlaces $\beta(1-2)$. La molécula de inulina más corta es el trisacárido 1-cestosa. Las neoserias de inulina tiene 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 C6 de la glucosa. Los levanos, partiendo de la 6-cestosa, contienen unidades de fructosa conectadas por enlaces $\beta(2-6)$. Puede también encontrarse fructanos

del tipo mixto, que consisten de residuos de fructosa unidos por un enlace $\beta(2-6)$ con ramificaciones $\beta(2-1)$ (Vijn y Smeekens, 1999)

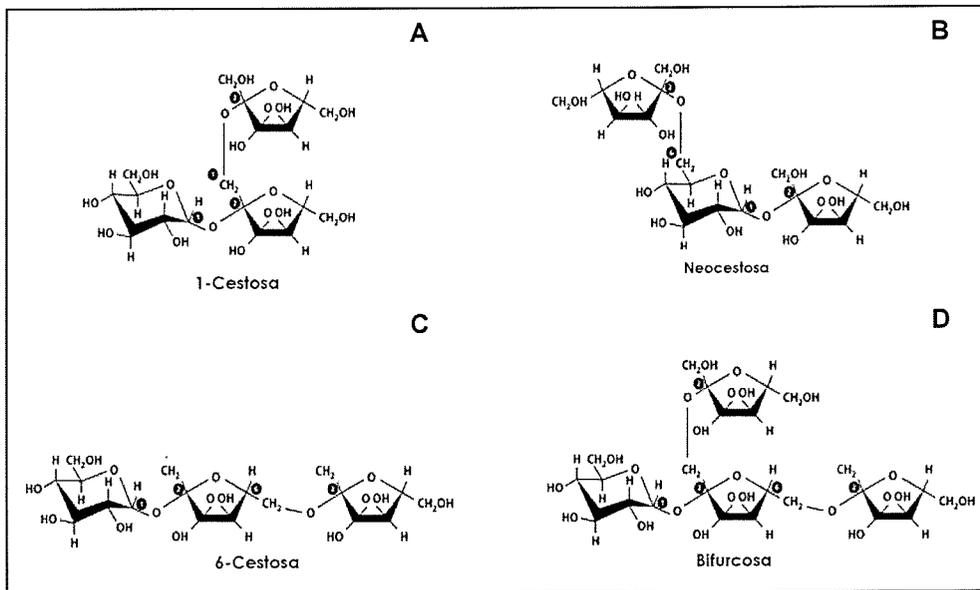


Figura 2. Principales estructuras de fructanos. A) 1-cestosa. B) neocestosa. C) 6-cestosa. D) bifurcosa. (Adaptado Vijn y Smeekens, 1999).

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 implicada en la carcinogénesis (Buddington *et al.*, 1996).

El aparato digestivo humano no contiene las enzimas capaces de degradar fructanos, por lo tanto, existe un gran interés en el sector alimentario por utilizarlos como ingredientes con pocas calorías y fibra dietética (Ritsema y Smeekens, 2003; Gibson *et al.*, 1995).

También se ha observado que en una dieta rica en fructanos, disminuyen las concentraciones de colesterol, triacilglicerol y fosfolípidos en suero (Ritsema y Smeekens, 2003).

El aporte de polifruktanos en la dieta normal, considerando la inulina y fructo-oligosacáridos, se ha establecido entre 3 y 12 gramos al día en la dieta occidental (Roberfroid, 1993).

3.5 Plantas del género *Agave* como fuente de prebióticos

El agave forma parte de la familia *Agavaceae*, que es endémica de América y se distribuye en el sur de Canadá, México, Centroamérica, norte de Sudamérica e islas del caribe. En griego, agave, agavus, significa “admirable”, y fue a partir de la especie *Agave americana* que Carlos Linneo describió el género en 1753 (Valenzuela, 2003).

México se considera el centro del origen y biodiversidad del género del *Agave*; de las 310 especies reportadas, cerca de 272 se pueden encontrar en este país (García y Galván 1995). Los estudios de Méndez (1999), concluyen que el *Agave* maduro contiene una mayor concentración de fructanos con un alto grado de polimerización y cantidades mínimas de glucosa y fructosa. Los fructanos presentes en el agave se sintetizan y se almacenan en los vástagos, y su función principal en estas plantas es la de almacenaje; también pueden actuar como osmoprotectores durante la sequía, lo que constituiría otra posible adaptación fisiológica a los ambientes áridos. Además de la importancia fisiológica de los fructanos en los *Agaves*, éstos son la fuente de azúcares fermentables en el proceso de elaboración del tequila (López *et al.*, 2003).

En el *Agave tequilana* se encuentran tres formas de los tipos de fructanos conocidos: inulina, levano y neoinulina, la presencia de los diferentes enlaces y datos de resonancia magnética nuclear han permitido establecer la estructura molecular de los fructanos de *Agave tequilana* (Figura 3) (López *et al.*, 2003).

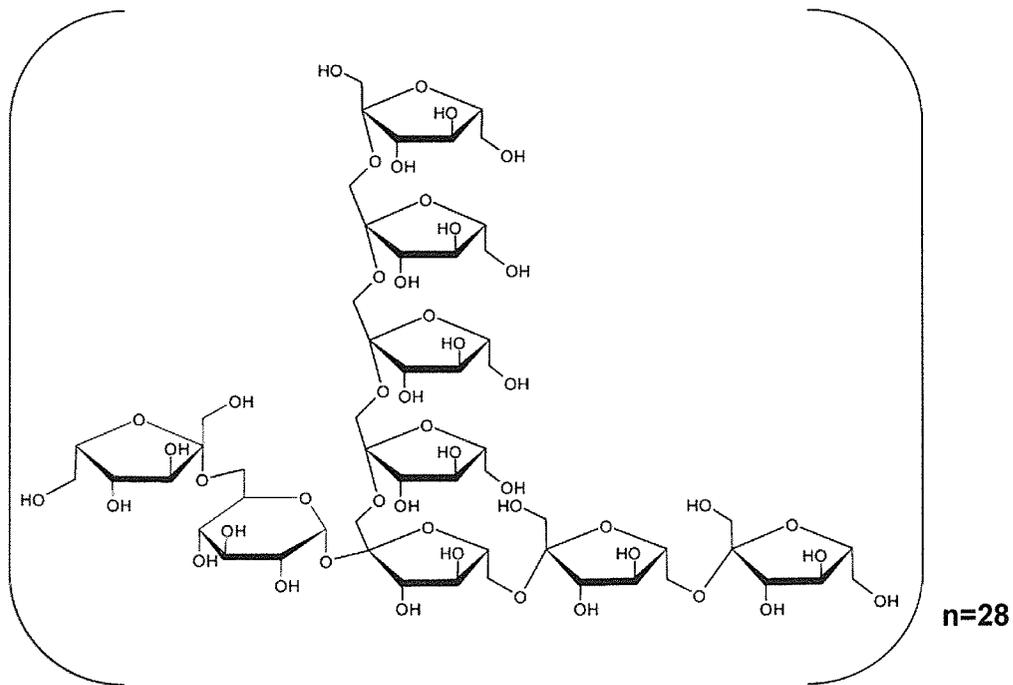


Figura 3. Estructura propuesta para los fructanos presentes en *Agave tequilana*. (Tomado de López *et al.*, 2003)

3.6 Simbióticos

Los simbióticos consisten en una mezcla de probióticos y de prebióticos, que mejoran la sobrevivencia y la implantación de suplementos dietéticos de microbios vivos en el tracto gastrointestinal (Ballabriga, 2001)

El estudio de los alimentos ha beneficiado mas allá de los nutrientes básicos que éstos proveen; recientemente ha surgido en nutrición el concepto de “alimentos funcionales”, es decir, alimentos e ingredientes alimenticios que pueden mejorar la salud (Diplock *et al.*, 1999).

Entre los alimentos funcionales podemos encontrar a los probióticos, prebióticos y simbióticos, los cuales ejercen un efecto favorable en el ecosistema del colon, por lo cual han recibido un mayor interés en la investigación (Casiragh *et al.*, 2007).

Una manera de controlar las enfermedades y mantener la salud es mediante una dieta con bacterias y suplementos de carbohidratos que ayuden a las comunidades de flora indígena del huésped a formar una barrera contra patógenos invasores, esto comprende el uso de probióticos y prebióticos. (Rastall *et al.*, 2005)

Comúnmente se utilizan fructo-oligosacáridos asociados con bifidobacterias, con la ventaja de asociar la adición microbiana viva propia del probiótico con un sustrato específico para el crecimiento, función característica del prebiótico (Gibson y Roberfroid, 1994).

En virtud de que la industria tequilera no tiene la capacidad de consumir toda la piña que se está produciendo, se ha propuesto un uso alternativo para el *Agave tequilana*

3.7 Proteómica

La proteómica es la caracterización a gran escala del proteoma de una línea celular, tejido u organismo (Grave y Haystead, 2002).

Un proteoma se define como el conjunto de proteínas totales expresadas de un genoma bajo ciertas condiciones fisiológicas. De modo que de un mismo genoma se pueden obtener diversos proteomas, dando una vista de dinamismo de la maquinaria celular (Anglade *et al.*, 2000).

El desarrollo de técnicas en los métodos de separación de proteínas permite el análisis simultáneo de una proporción significativa de proteomas celulares, así los métodos de identificación de proteínas pueden llevar a la unión del proteoma y el genoma para proporcionar una imagen global de metabolismo celular. La proteómica provee de datos cualitativos de proteínas codificadas por genomas bacterianos junto con datos cuantitativos de la respuesta de la síntesis de una proteína en condiciones ambientales definidas (Cash, 2000).

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) es un método poderoso que permite separar mezclas complejas de extractos proteínicos. Esta técnica se basa en la separación de las proteínas utilizando

dos propiedades independientes, el punto isoeléctrico (primera dimensión) y la masa molecular (segunda dimensión), como se muestra en la Figura 4.

Cada punto resultante del arreglo bidimensional corresponde a una proteína individual de la muestra. Miles de proteínas diferentes pueden separarse para obtener la información de su punto isoeléctrico, peso molecular y concentración (Berkelman, 2002).

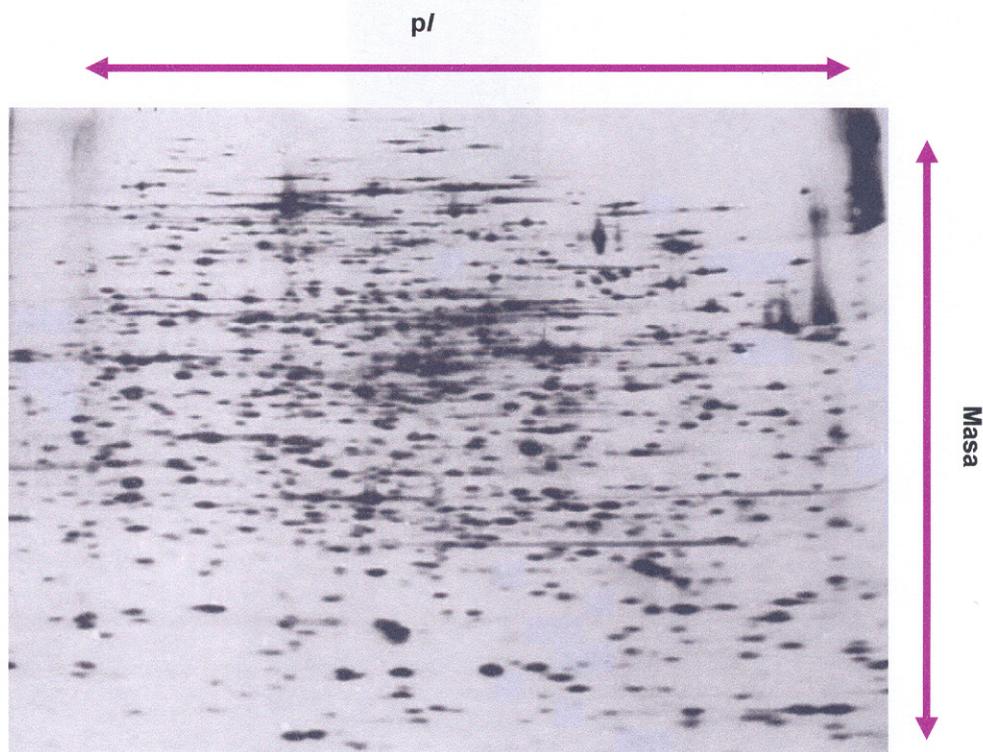


Figura 4. Ejemplificación de un gel bidimensional de poliacrilamida.

La electroforesis de doble dimensión y el análisis por espectrometría de masas, han contribuido en gran manera a la investigación experimental de los proteomas de sistemas biológicos complejos. Estas herramientas tienen éxito al estudiar la cantidad y localización subcelular de proteínas individuales, para examinar los cambios en los patrones de expresión entre las diferentes fases

de crecimiento y en la respuesta a estímulos, o a identificar genes blanco de proteínas reguladoras (Vitali *et al.*, 2005).

3.7.1 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, por ejemplo, la masa de los péptidos o la secuencia de aminoácidos (Figura 5). Esta técnica implica básicamente la extracción de proteína del gel, su digestión con tripsina para la posterior conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante una ionización-desorción láser asistida con matriz (MALDI, por sus siglas en inglés), posteriormente la separación de los iones según su relación masa/carga (m/z) en un analizador de masas, por ejemplo un analizador de tiempo de vuelo (TOF por sus siglas en inglés), cuadrupolo, trampa iónica, etc. La detección de las masas proporciona un espectro que refleja la abundancia de los iones frente a su valor m/z . 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 bidimensional se utilizó en estudios proteómicos de distintas bacterias, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Lactococcus lactis*, *Shigella flexneri*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio cholerae*, y *Brucella melitensi* (Yuan *et al.*, 2006).

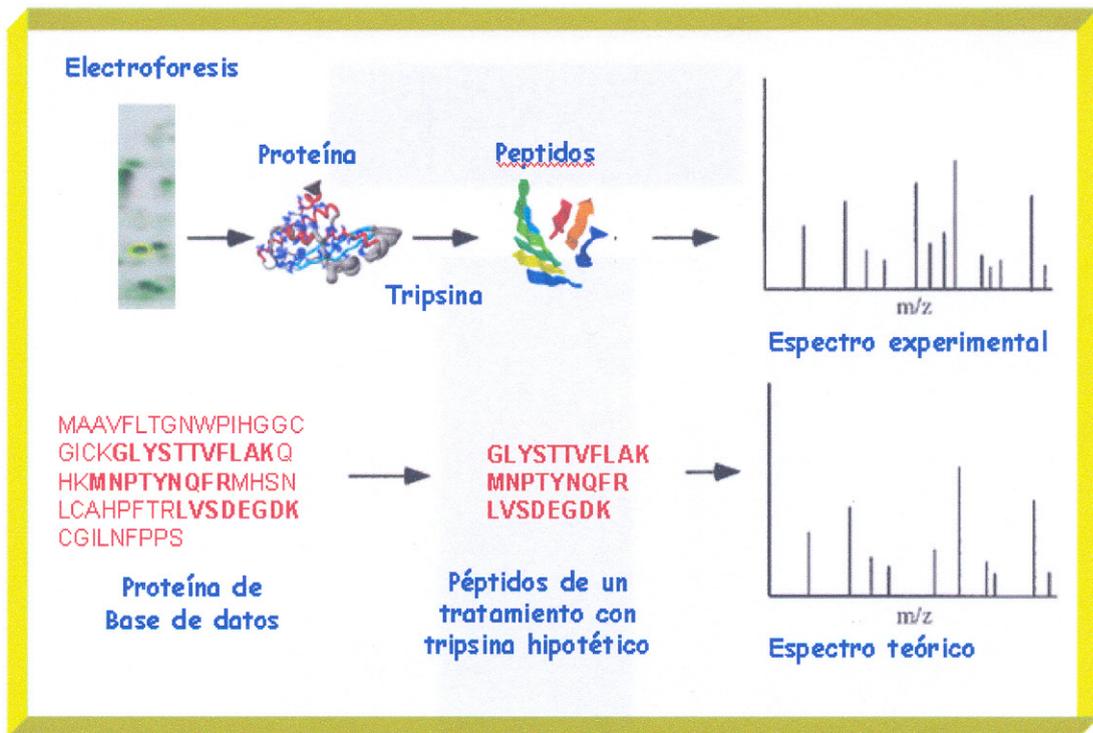


Figura 5. Estrategia para la identificación de una proteína mediante mapeo peptídico.

3.8 Microscopia de Fuerza Atómica

La microscopia de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés), funciona escaneando la muestra y registrando la atracción o repulsión entre esta y una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica montada en una palanca microscópica muy flexible (Figura 6). Esta interacción es monitoreada mediante un láser que es reflejado por la palanca hacia un detector el cual construye una imagen para obtener la topografía de la superficie de la muestra. Las aplicaciones de esta técnica en la biología celular se ha clasificado en: obtención de imágenes, estudios de micromanipulación y la medición de fuerza de unión. Es una herramienta importante para el estudio de procesos de adaptación celular en respuesta a estímulos mecánicos (Alessandrini y Facci, 2005).

El estudio de la superficie de bacterias ha revelado detalles que por microscopia óptica son imposibles de detectar; empleando esta técnica se ha

obtenido imágenes de la ultra estructura de las esporas del hongo *Phanerocheete Chrysorium* (Dufrene *et al.*, 1999).

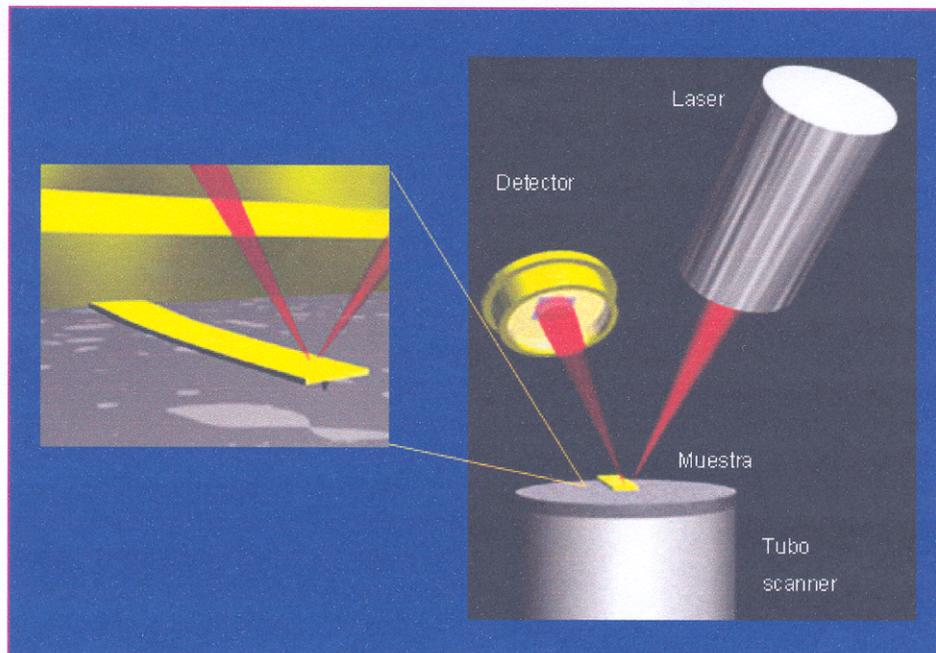


Figura 6. Esquema del funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar los cambios a nivel proteoma de *Bifidobacterium longum* al crecer en presencia de fructanos de *Agave tequilana* como fuente de carbono.

4.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar la metodología para la obtención de patrones bidimensionales de *Bifidobacterium longum* al usar fructanos como fuente de carbono.
- Analizar los patrones 2D para determinar que proteínas se encuentran aumentadas o disminuidas en las distintas fuentes de carbono.
- Caracterizar las proteínas diferenciales por espectrometría de masas y análisis bioinformático.
- Evaluar la morfología de *B. longum* por microscopía de fuerza atómica al crecerlo en fructanos como fuente de carbono.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Microorganismo y medios de cultivo

Para el crecimiento de *Bifidobacterium longum* ATCC15707 se prepararon los medios Mann Rogosa & Sharpe (MRS) y mínimo suplementados con L-cisteína 0.05% (p/v). La cepa se reactivó en cada uno de estos medios por separado y posteriormente se realizó una dilución 1:40 con medio fresco. Para evaluar el efecto de los fructanos de *Agave tequilana* sobre el cultivo bacteriano el medio MRS y el medio mínimo (Apéndice J) fueron preparados libres de glucosa y suplementados con fructanos con una concentración de 20 g/L, que fueron esterilizados por separado. Esta concentración de fructanos fue reportada para un crecimiento óptimo de bifidobacterias por Van der Meulen (2004).

5.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 24 h en una jarra de anaerobiosis. Se tomaron muestras cada 3 horas y se midió la densidad óptica a 600 nm.

5.3 Microscopia de fuerza atómica

De los cultivos de 24 horas se tomó 1 mililitro de muestra y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. El paquete celular se lavó con TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM). Posteriormente se realizó un frotis en un cubreobjetos el cual se fijó por calor, el cubreobjetos fue cortado al tamaño del porta muestras del microscopio de fuerza atómica. Se buscaron campos en los que se tuviera acceso a células individuales para poder realizar mediciones mediante el software WinSPM versión 2.02 de JEOL.

5.4 Análisis estadístico

Las mediciones de las dimensiones de las células de *B. longum* crecidas en las dos condiciones fueron analizadas en el software GraphPad Prism 5.0 de GaphPad para encontrar diferencias significativas utilizando la prueba t de student.

5.5 Preparación del extracto proteínico celular

Las células de los cultivos fueron empaquetadas por centrifugación a 8000 rpm por 10 min, realizando posteriormente cuatro lavados con TE. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 500 μ L del buffer de extracción ácida (Herbert *et al.*, 2006) que contiene: urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4 % (w/v) y ácido cítrico 80 mM pH 4. Se sonicó con intervalos de 9.9 segundos por 1.5 min, posteriormente se añadió un volumen igual de perlas de vidrio para agitar en vortex por 30 seg y enfriar en hielo por 30 seg por 8 ciclos. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4 °C para recuperar el sobrenadante. Se utilizó el kit comercial 2D-Clean up (GE Healthcare) para precipitar las proteínas y eliminar sales y otras sustancias que pudieran interferir en el isoelectroenfoque, finalmente, las proteínas fueron resuspendidas en la solución de rehidratación.

5.6 Cuantificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad), el cual permite determinar la concentración de la proteína soluble.

Se preparó Albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich) a una concentración de 1.4 mg/mL y se prepararon las 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 (μ L)	Agua (μ L)
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 milli Q, a continuación 20 μ L de cada estándar o muestra se mezclaron con 1 mL de reactivo diluido. Se incubaron a temperatura ambiente por al menos 5 min, posteriormente cada reacción se midió a una absorbancia a 595 nm y se comparó con la curva de calibración de BSA para determinar la concentración de proteína presente.

5.7 Electroforesis bidimensional

5.7.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque

Se utilizaron tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 7 o 13 cm con intervalos de pH de 3 a 10 y 4 a 7 (GE Healthcare). Se agregó 250 μ L de las muestras en la charola de rehidratación y la cubierta protectora del gel fue retirada empezando por el lado ácido. La tira se colocó con el gel en contacto con la muestra evitando la formación de burbujas. Para evitar la evaporación la tira se cubrió con 3 mL de aceite mineral (GE Healthcare). La rehidratación se llevó a cabo a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 10 horas.

La charola de cerámica se colocó en el equipo Ettan IPGphor II (Figura 9) y cada carril se llenó con 9 mL de aceite de cubierta, se transfirió la tira con el gel hacia arriba con el ánodo del lado positivo del equipo, se colocaron las esponjas hidratadas con 125 μ L de agua desionizada en cada extremo de la tira y posteriormente se colocaron los electrodos haciendo contacto con la plataforma del equipo. Una vez armado el equipo, éste se programó en la modalidad de Volt-hours (kVh) de acuerdo a la Tabla 3.

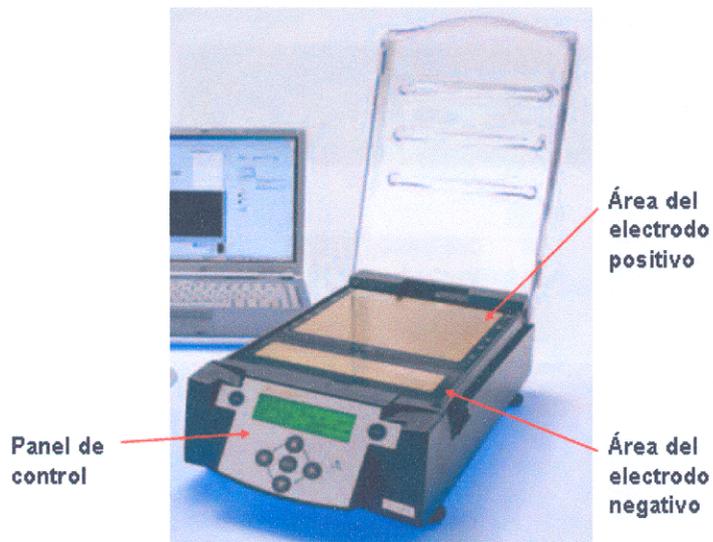


Figura 7. Equipo Ettan IPGphor II y sus partes.

Tabla 3 Programación del equipo Ettan IPGphor

Longitud de la tira	Rango de pH	Paso y modo de voltaje	Voltaje	Volt-hours (kVh)
7 cm	4 - 7	1 Gradiente	500	0.01
		2 Gradiente	4000	5.6
		3 Step and Hold	5000	2.5
		Total		8.0
13 cm	4 - 7	1 Gradiente	500	0.01
		2 Gradiente	4000	5.6
		3 Step and Hold	8000	15.2
		Total		20.8

5.7.2 Segunda dimensión: SDS PAGE

La separación por peso molecular se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (Apéndice I).

Una vez terminada la separación por punto isoeléctrico, la tira se equilibró por 15 min en 2 mL de solución de equilibrio (Apéndice D) con 0.01 g/ml de DTT

(ditiotreitól). Posteriormente, la tira se colocó en el gel y se fijó con agarosa al 0.5 % (Apéndice H). Los geles se corrieron utilizando buffer de corrida (Apéndice G) a 10 mA hasta que la muestra alcanzó el gel separador y se aumentó a 20 mA por gel con un tiempo aproximado de 3 h.

5.8 Tinción

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Apéndice) por una hora y posteriormente se agregó la solución de desteñido (Apéndice). Cuando el fondo fue eliminado se tomó una fotografía en el sistema de fotodocumentación Gel-doc (BioRad).

5.9 Análisis de los geles

Los geles se analizaron con el programa PDQuest (Bio-Rad), el cual elimina puntos tenues, sobrelapados o barridos, generando una imagen con puntos que puedan ser identificados y cuantificados. Para obtener la cantidad de puntos presentes en cada gel y compararlos cualitativa y semicuantitativamente entre sí marcando las diferencias entre estos.

5.10 Identificación de proteínas

Las manchas diferenciales encontradas en los geles fueron cortadas manualmente con una punta estéril y se almacenaron en tubos eppendorf. Las manchas fueron enviadas al Protein Chemistry Laboratory de la Universidad A&M de Texas. Los valores obtenidos de la digestión con tripsina se analizaron en la base de datos utilizando el programa MASCOT.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Utilización de fructanos como fuente de carbono

En la figura 8 se presentan las curvas de crecimiento de *B. longum* en los diferentes medios: MRS, medio con fructanos, medio mínimo con glucosa y medio mínimo con fructanos. Hasta las 6 horas estos se mantuvieron en una fase lag similar, las diferencias en el crecimiento comenzaron a las 9 horas. Como era de esperarse, el mayor crecimiento se observó en el medio comercial MRS, cuya principal fuente de carbono es glucosa y es rico en nutrientes.

Bifidobacterium longum fue capaz de crecer en el medio de cultivo suplementado con fructanos de *Agave tequilana* (20g/L) como fuente de carbono, se aprecia que fue el primero en entrar a una fase exponencial y mantuvo su densidad celular en fase estacionaria. El medio mínimo con glucosa mostró un crecimiento similar al medio con fructanos. Mientras que el menor crecimiento fue observado en el medio mínimo con fructanos.

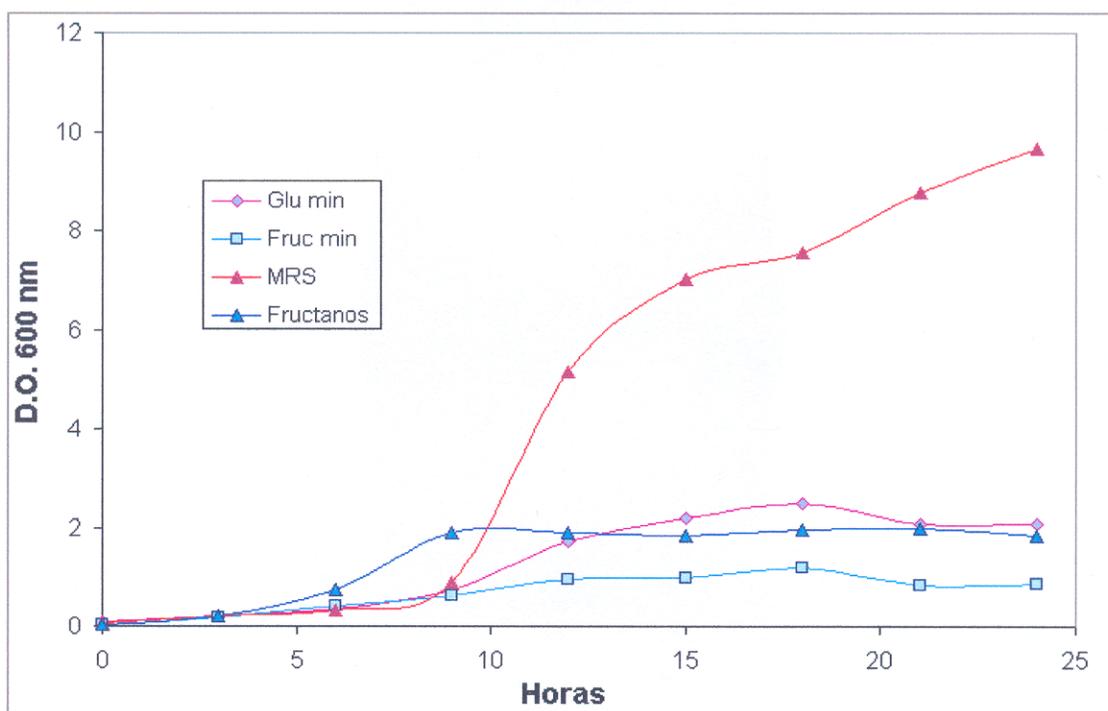


Figura 8. Cinética de crecimiento de *B. longum* en diferentes fuentes de carbono. MRS, medio con fructanos, medio mínimo con glucosa y medio mínimo con fructanos como fuente de carbono.

El crecimiento obtenido al usar fructanos es similar al reportado para *B. animalis* usando Raftilosa, un fructano comercial (Van der Meulen, 2004) y al obtenido para *B. adolescentis* usando transoligosacaridos (Van Laere *et al.*, 2000).

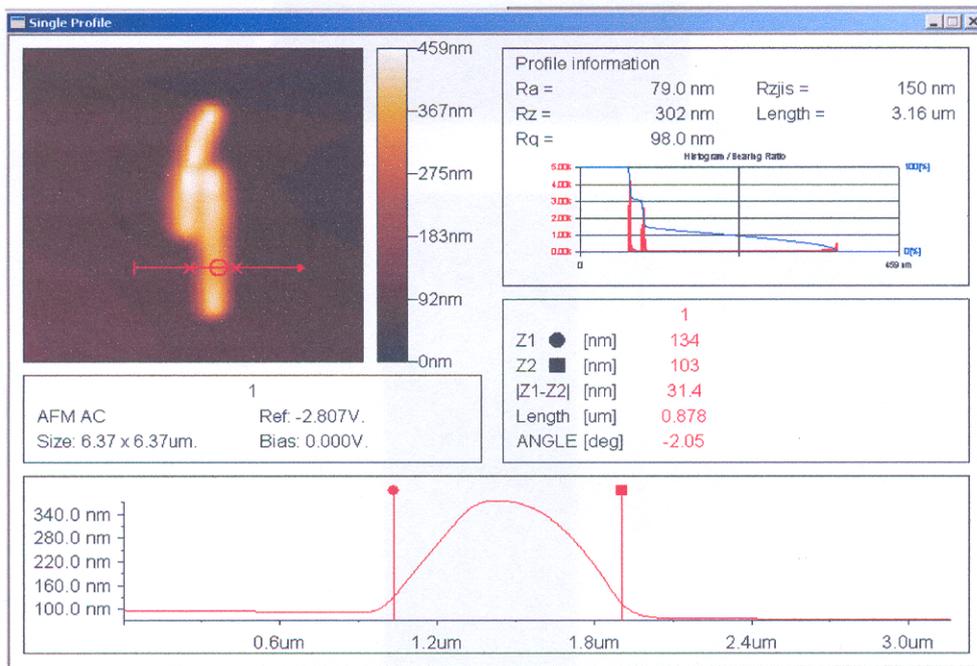
En el medio MRS el crecimiento observado fue significativamente mayor al medio completo con fructanos y a los medios mínimos (Tabla 4). El ambiente donde se encuentra presente *B. longum* es pobre en azúcares simples; ya que la densidad celular en el medio con fructanos fue muy similar al medio mínimo con glucosa, se espera que las bifidobacterias sean capaces de utilizar los fructanos como principal fuente de carbono en el colon.

Tabla 4. Crecimiento máximo de *B. longum* en los diferentes medios

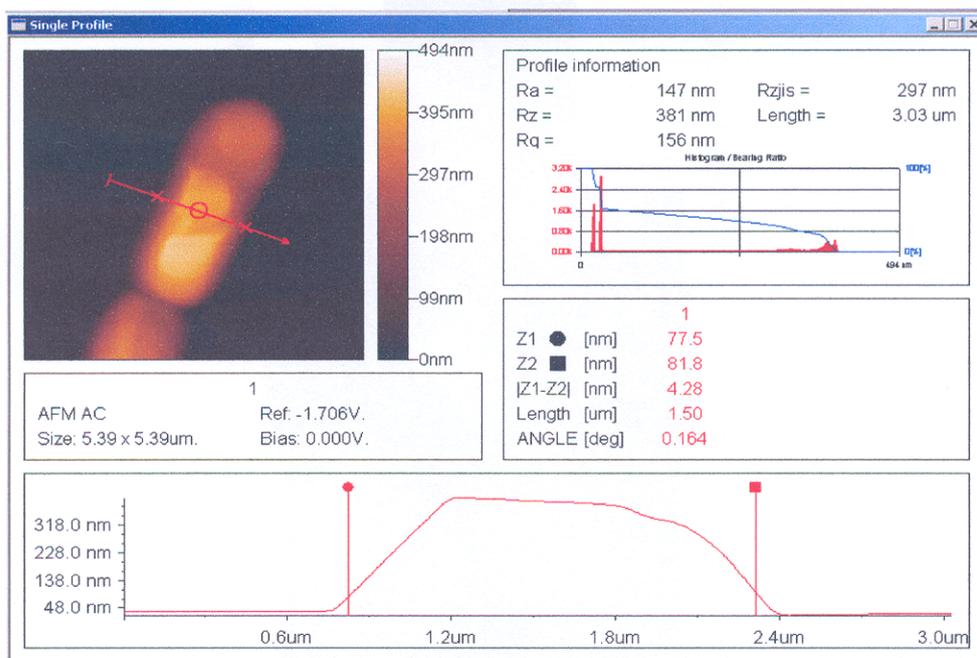
Medio	D.O. máxima
MRS	9.6477
Fructanos	2.1242
Glucosa mínimo	2.0883
Fructanos mínimo	0.8566

6.2 Cambios morfológicos

Mediante el análisis con el software WinSPM (Figura 9), se observaron las dimensiones de *B. longum*; las bacterias crecidas en medio con fructanos fueron de un tamaño significativamente mayor ($P < 0.05$) que las bacterias crecidas en el medio con glucosa (Figura 10). tanto en su longitud, 2 μm en glucosa y 2.9 μm en fructanos; como en su anchura, 0.8 μm en glucosa y 1.06 μm en fructanos.



A



B

Figura 9. Análisis dimensional de las imágenes obtenidas por microscopia de fuerza atómica A) medio con glucosa y B) medio con fructanos de *Agave tequilana*.

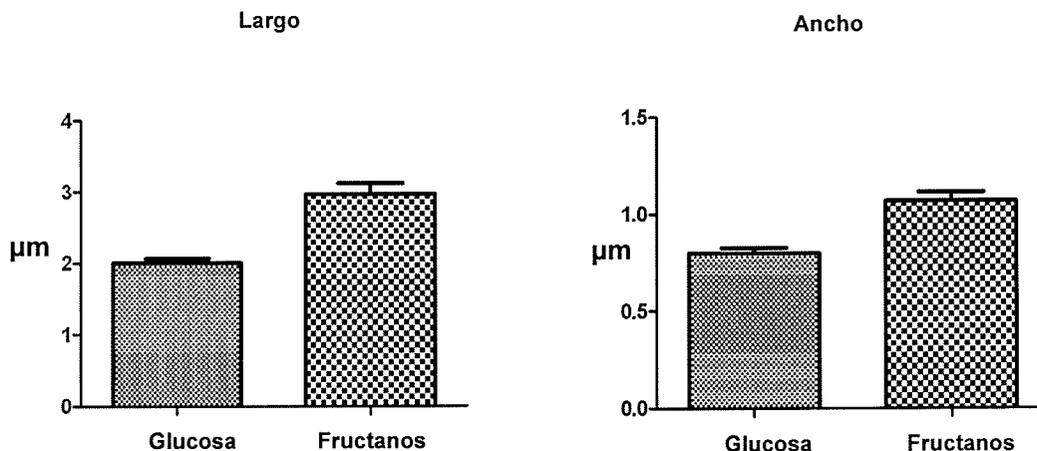


Figura 10. Comparación de las dimensiones de *B. longum* en diferente fuente de carbono.

La morfología celular reportada en el medio MRS (Kijn *et al.*, 2005) se mantiene en forma de bacilos no importando la fuente de carbono que se este utilizando (Figura 11).

Los cambios en el diámetro de las bacterias dependen de factores como el tipo de célula, la temperatura y nutrientes (Van De Merwe *et al.*, 1997). La morfología celular en las bacterias depende en gran medida del mecanismo para la síntesis de peptidoglicanos (Young, 2003). Las variaciones en el tamaño celular podrían estudiarse de una manera mas profunda, para encontrar qué mecanismos están involucrados en el incremento de las dimensiones celulares, ya que una manera en la cual las bifidobacterias ejercen su efecto probiótico es compitiendo con virus y bacterias patógenas por sitios de unión a células epiteliales, previniendo infecciones (Picard *et al.*, 2005).

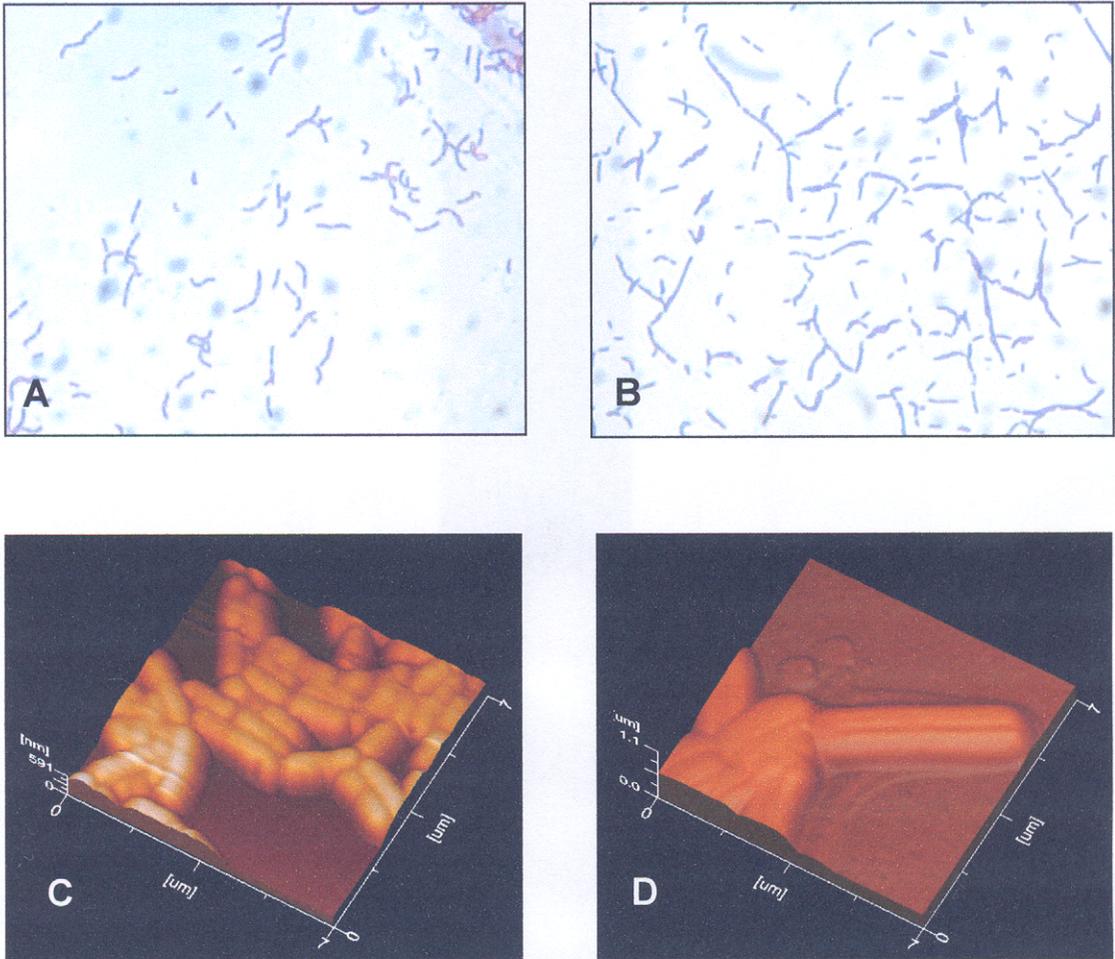


Figura 11. Morfología microscópica de *Bifidobacterium longum*. Tinción Gram A) medio con glucosa y B) medio con fructanos de *Agave tequilana*. Microscopia de fuerza atómica C) Glucosa y D) medio con fructanos de *Agave tequilana*.

6.3 Electroforesis bidimensional

Al estandarizar el procedimiento para la obtención de los geles bidimensionales se encontró que el método más eficaz para una buena resolución de los patrones en el proteoma fue la extracción de proteínas en medio ácido (Figura 12), lo cual está reportado para microorganismos que poseen pared celular, cuyos polisacáridos se solubilizan interfiriendo en el isoelectroenfoco de la primera dimensión (Herbert *et al.* 2006).

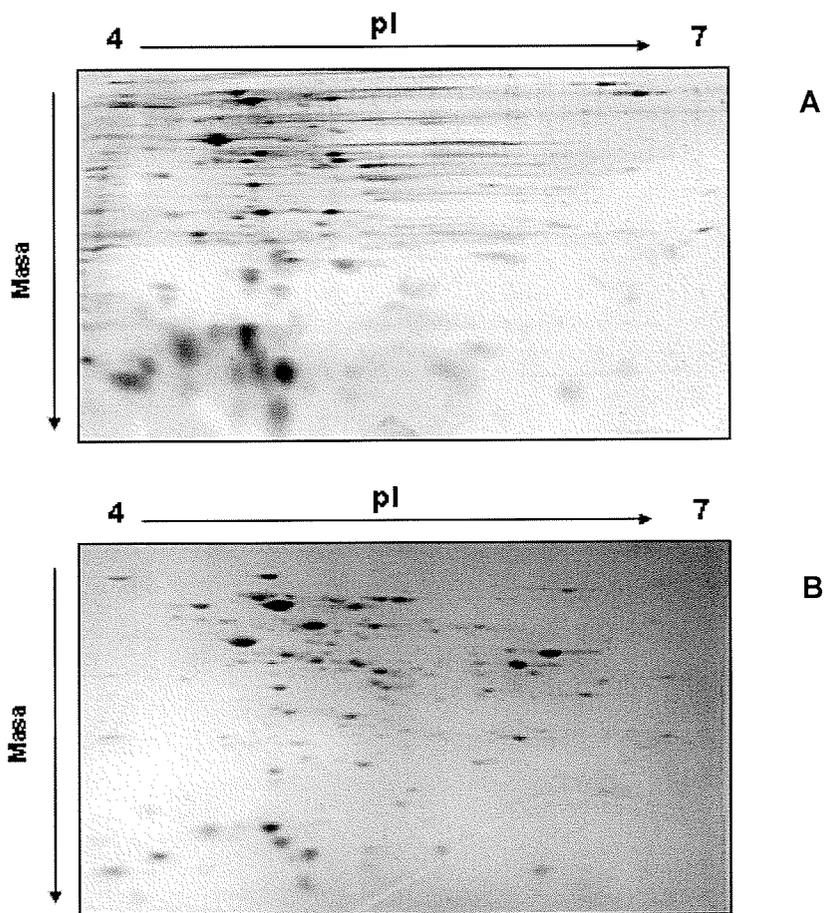


Figura 12. Comparación de los métodos de extracción de proteínas. A) extracción alcalina, B) extracción ácida

De acuerdo con el estudio del proteoma global de *Bifidobacterium longum* NCC2705 realizado en febrero del 2006 por Yuan *et al.*, en el que

calcularon el punto isoeléctrico de los 1727 ORF's presentes en el genoma, el 71.7% de las proteínas se encuentran en un intervalo de pI de 3 a 7.

En la presente investigación se confirmó esto realizando un gel con un intervalo de pI de 3 a 10 (Figura 13).

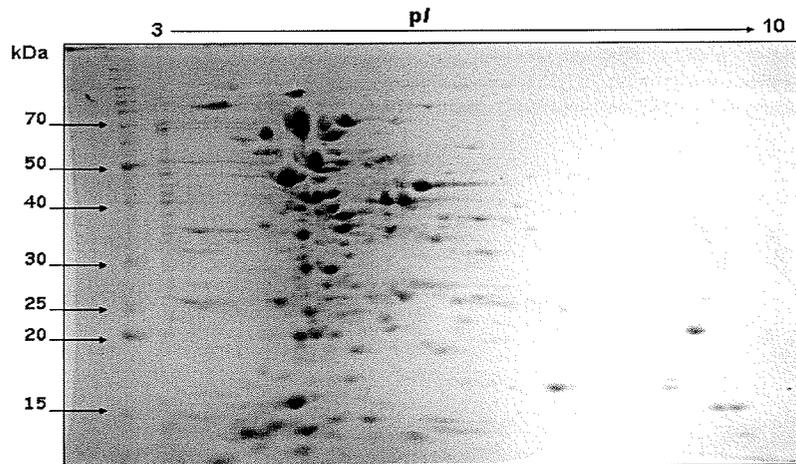


Figura 13. Gel de poliacrilamida al 12% utilizando tiras de 7 cm con rango de pH 3 – 10. la mayor cantidad de proteína se localiza en el rango de 3 a 7

En base a lo anterior se decidió utilizar tiras con un intervalo de pH mas cerrado (pH 4 a 7), y de 13 cm para lograr una mejor separación y definición de los puntos observando una mejor distribución en todo el gel (Figura 14).

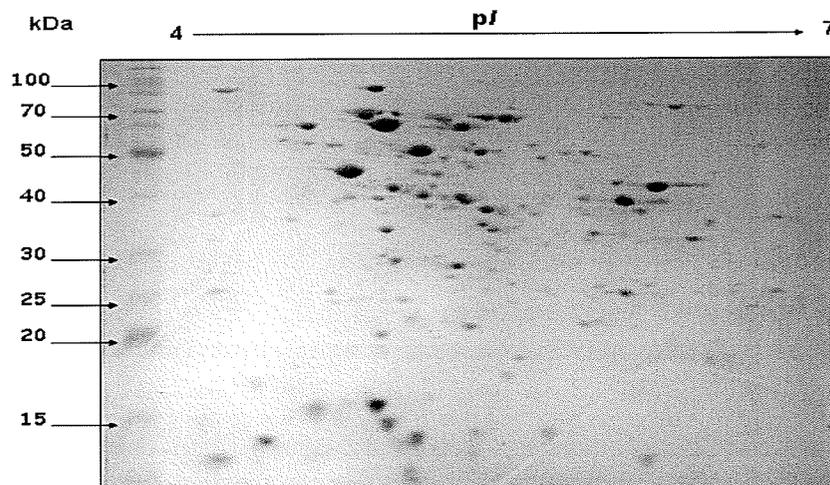


Figura 14. Gel de poliacrilamida al 12% utilizando tiras de 13 cm con intervalo de pH 4 – 7.

6.4 Análisis de los geles

El análisis de los geles se realizó mediante el software PDQuest (BioRad), en el cual se pueden comparar los patrones de proteínas sobreponiendo ambos geles uno sobre el otro. Se observaron proteínas diferenciales en los geles de *B. longum* en las distintas fuentes de carbono (Figura 15).

El software realiza un análisis semicuantitativo en base a la intensidad del punto (Figura 16), se utilizó el gel de *B. longum* crecido en MRS como control y el gel en fructanos de *Agave tequilana* 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 (2 o mas), para la disminución el contenido se detecta si el punto tiene la mitad de intensidad (0.5 o menos).

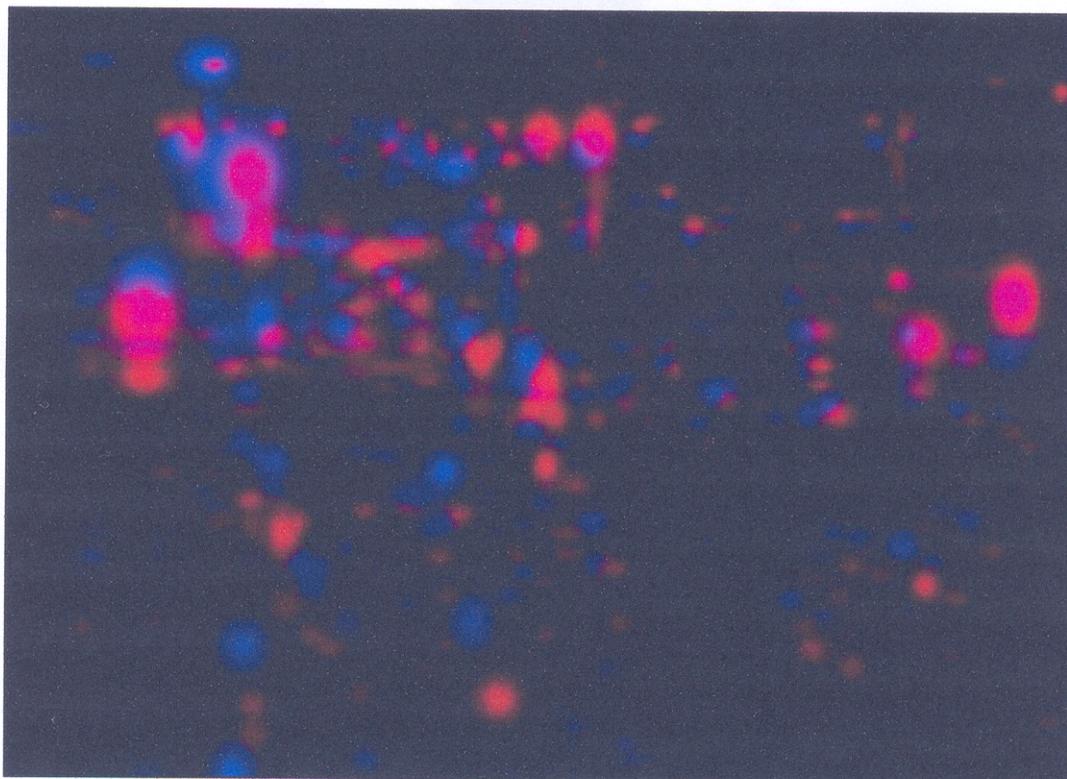


Figura 15. Vista multicanal de los geles bidimensionales de *B. longum*. En rojo Glucosa y en azul fructanos.

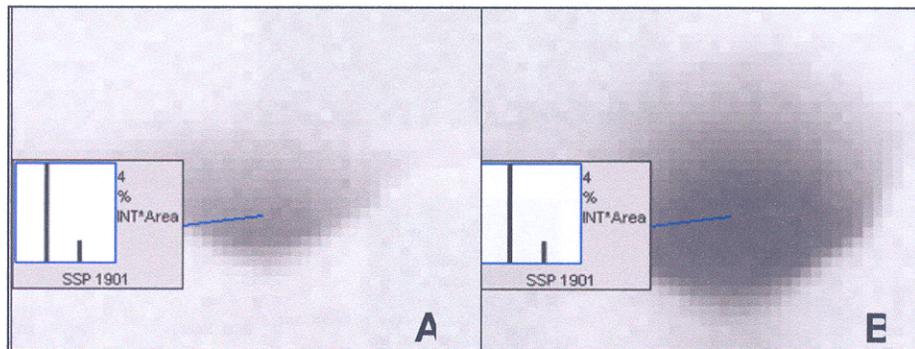


Figura 16. Análisis semicuantitativo de una mancha aumentada en intensidad. A) glucosa y B) fructanos de *Agave*.

El análisis semicuantitativo realizado mostró 7 proteínas en mayor cantidad, indicadas en rojo; 2 en menor, en amarillo y 30 iguales, en azul, respecto al control (Figura 17).

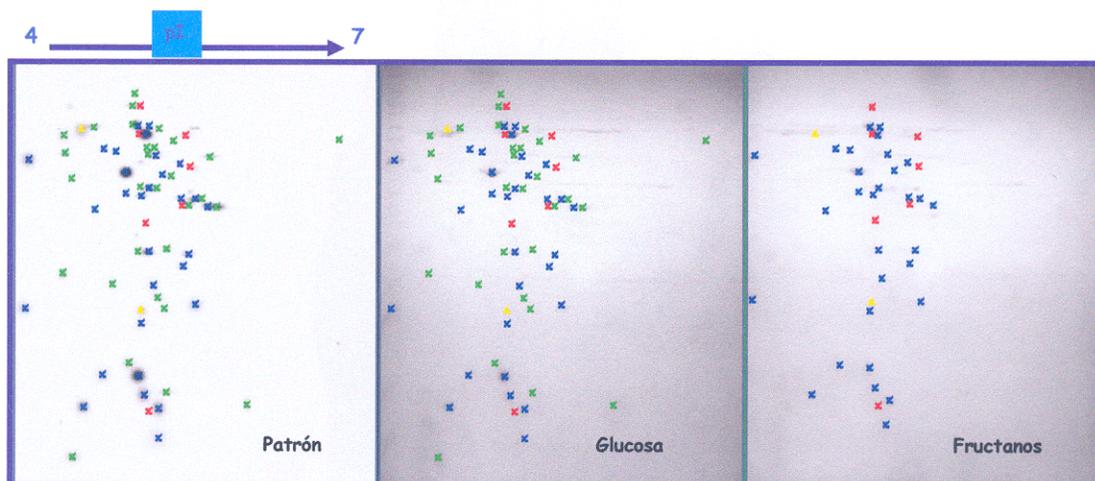


Figura 17. Análisis semicuantitativo de los geles bidimensionales de *B. longum* usando distintas fuentes de carbono.

6.4.1 Análisis en medio mínimo

El análisis de los geles bidimensionales en las condiciones de medio mínimo reveló un patrón similar en el proteoma y observamos algunos de los mismos puntos diferenciales (Figura 18).

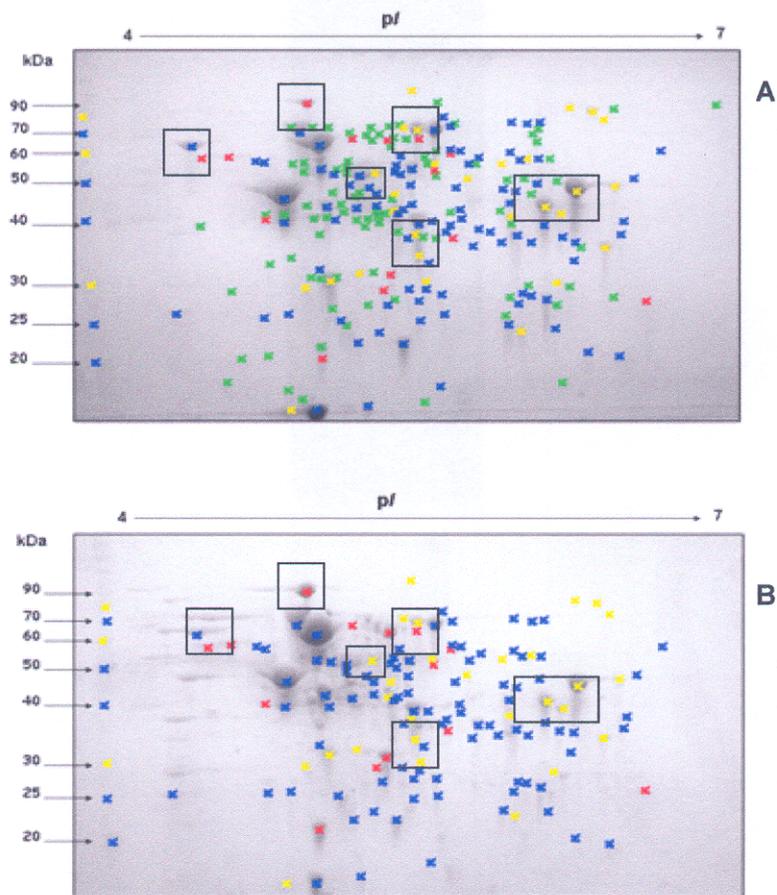


Figura 18. Patrones bidimensionales de *B. longum* en medio mínimo.
A) Glucosa y B) fructanos de *Agave*. En rectángulo puntos encontrados en medios completos

6.5 Espectrometría de masas

Los puntos de la Figura 19 muestran las proteínas que se cortaron manualmente y se enviaron para el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. Siete de los puntos representan proteínas que aumentaron su

intensidad (BL02, BL04, BL05, BL7, BL10, BL15, BL16), cinco disminuyeron (BL06, BL11, BL12, BL13, BL17) y seis (BL01, BL03, BL08, BL09, BL14, BL18) son similares cuando son usados los fructanos de *Agave tequilana* como fuente de carbono.

Con las masas obtenidas de la digestión triptica se buscó la identidad de las proteínas en las bases de datos (NCBI y Swisprot) del software Mascot; como se indica en la Figura 20 las secuencias de los péptidos similares son resaltadas en rojo.

Las proteínas con mejores puntajes que se encontraron en la búsqueda se muestran agrupadas por categorías funcionales en la tabla 4.

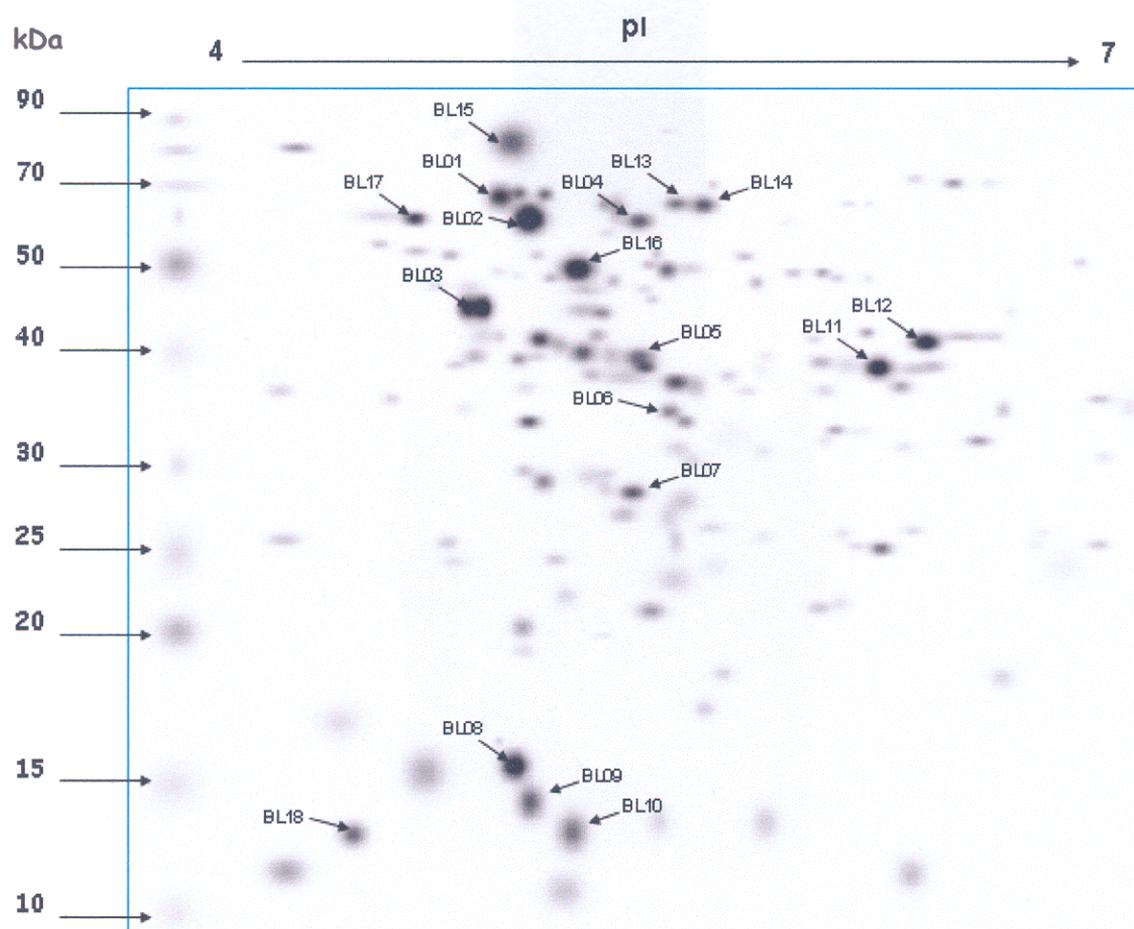


Figura 19. Imagen patrón obtenida por PDQuest. Se indican las manchas a analizar en los geles bidimensionales de *B. longum*.

MASCOT
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|23335675](#) Score: 49 Expect: 2.7
CG0364: Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase [Bifidobacterium longum DJ010A]

Nominal mass (M_r): 57372; Calculated pI value: 6.36
 NCBI BLAST search of [gi|23335675](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Bifidobacterium longum DJ010A](#)

Fixed modifications: Carboxymethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: 30
 Number of mass values matched: 16
 Sequence Coverage: 25%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1	MSESPNWSNP	LRDSRDLRLP	RIAGPCSLVI	FGVTGDLAQK	KLLPAVYDLA
51	NRGLLPPSFG	LTGFARRDWT	QERFIEFVKA	AVQAHCRTPF	KESTURNLAA
101	GIRFVQGTFD	DPEAFERLSA	TVQELDRDRG	TQGNHAFYMS	VPPRAFPQVA
151	KQLAASGLSR	SSEGAWRRVI	IEKPFQHDLA	SAKELDSVVS	EVPDPSSVFR
201	IDHYLGKETV	QNLALRFAN	AMYEPILWNA	YVDHVQITMA	EDIGIGGRAG
251	YYDGIGAARD	VIONHLLQLH	ALTAMEEPVS	FTAKDLTAEK	TKVLSAVRLP
301	KDLAANTARG	QYAKGWQGSN	EVVGYLEEKG	IDPKSTTETY	AAIRLDIDTR
351	RWAGVPPFYL	CGKRLGKRVT	EIAVVFKRAP	HLPFEQTAVR	ELGKNAIVIR
401	VQPDEGVNMR	FGAKVPGGST	MEVRDVNMDF	SYGRSFTENS	PEAYERLILD
451	VLLGDPPLFP	TTEEVNLSWE	ILDPIEQFWS	TLGQPQAYRA	GTWGPQAQDE
501	MLARDGRHWR	MP			

Figura 20. Resultado obtenido de la base de datos Mascot a partir de uno de los datos obtenidos por espectrometría de masas de *B. longum*.

Tabla 5. Proteínas seleccionadas de *B. longum* identificadas por MASCOT

Categoría	Punto	POSIBLE FUNCION*	No. de acceso	pl	Masa	Score
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	BL02	Complejo, piruvato / 2-oxoglutarato deshidrogenasa dihidrolipoamida aciltransferasa componente (E2) y enzimas relacionadas	ZP_0012162 2	4.80	14169	34
	BL03	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	ZP_0012090 9	6,36	57198	49
	BL17	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa / eritrosa-4-fosfato deshidrogenasa	ZP_0012192 7	5,58	10606	40
TRANSPORTE	BL01	Regulador de consumo de fosfato	ZP_0012183 2	4.55	24776	31
	BL04	Componente periplásmico del sistema transportador de azúcares tipo ABC	ZP_0012131 2	4,65	46947	32
	BL18	Permeasa de la superfamilia principal de facilitadores	ZP_0012147 0	4.65	45104	37
	BL14	DppD	NP_696553	5.91	73293	32
METABOLISMO DE AMINOACIDOS	BL15	Bifuncional shikimato cinasa / 3-dehidroquinato sintetasa	AAN24690	5,79	58733	31
	BL06	Gamma-glutamilcisteina sintetasa	ZP_0012076 7	4,95	48880	35
TRADUCCION	BL05	Valyl-tRNA sintetasa	YP_910313	5,27	10325 3	39
	BL12	Proteína de unión a GTP, EngA	NP_695919	7.78	51212	29
REPLICACION	BL10	Probable proteína de replicación, rep	AAN31777	8.95	34278	33
	BL13	Proteína de replicación putativa	YP_232881	9.90	29707	37
PRODUCCION DE ENERGIA	BL07	Subunidad beta de la ATP sintetasa tipo F0F1	ZP_0012176 0	4.77	53451	40
MODIFICACIONES POST TRANSCRIPCIONALES	BL08	Pseudouridina sintetasa	YP_909337	9.41	26265	34
MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES	BL16	Glutamato-ammonio-ligasa adeniltransferasa	AAN24610	5.81	12080 2	21
	BL09	Componente de la proteasa Clp con especificidad dependiente de ATP	YP_909452	5.59	52176	36
SINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS	BL11	Glicosiltransferasa I	YP_909259	5.46	54535	34

*En rojo: proteínas aumentadas en *B. longum* usando fructanos como fuente de carbono, en azul: proteínas similares y en amarillo: proteínas disminuidas

En los puntos de interés seleccionados para el análisis por espectrometría de masas, se encontraron proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (punto BL17, el cual se encuentra disminuido), presente en la glicólisis; también se encontró la glucosa 6-fosfato 1-deshidrogenasa (punto BL03, el cual permanece sin cambios), esta enzima se encuentra presente en la vía de las pentosas fosfato; además encontramos el componente E2 de las piruvato/oxoglutarato deshidrogenasas (punto BL02, en aumento), que son complejos enzimáticos con estructuras y mecanismos muy similares, la primera requerida para la conversión de piruvato en acetil coenzima A, iniciando el ciclo de krebs, y la segunda dentro de este ciclo participa en la transformación del 2-oxoglutarato en succinil coenzima A. Se identificó una permeasa de la superfamilia principal de facilitadores (punto BL18, sin cambios), que son permeasas, las cuales exhiben especificidad por metabolitos de este ciclo.

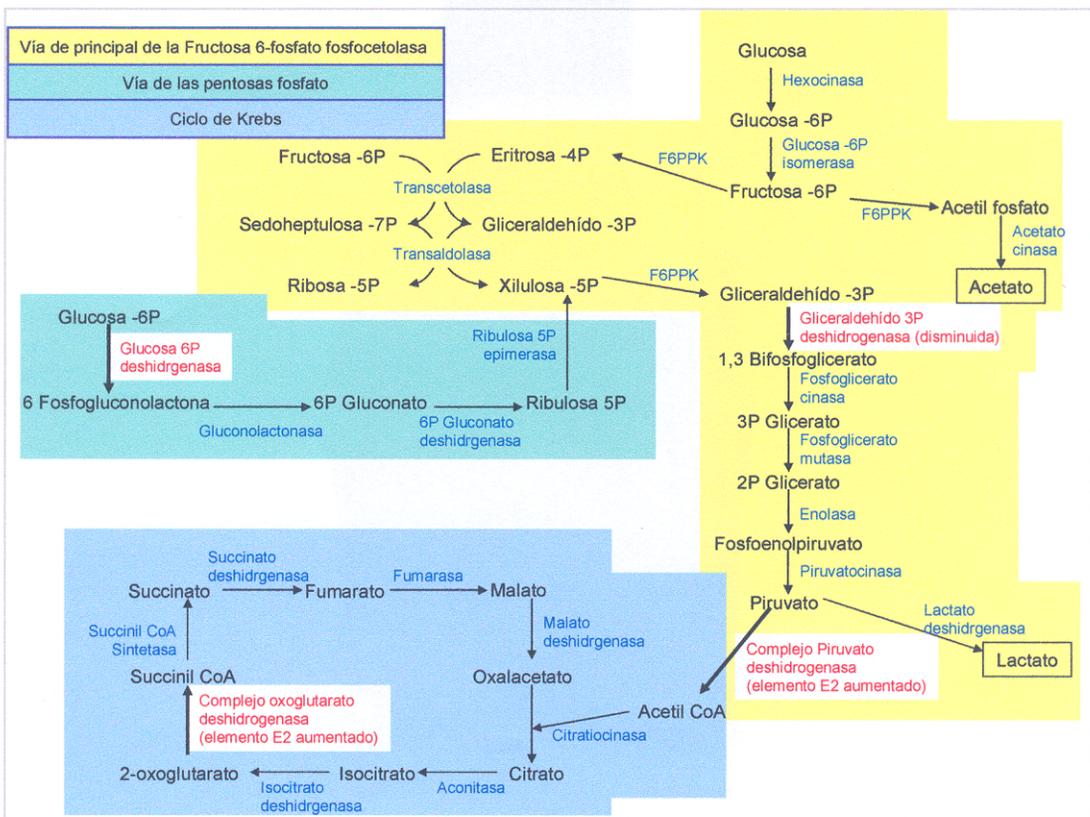


Figura 21. Vías del catabolismo de carbohidratos en *Bifidobacterium longum*. Se muestran en rojo las enzimas encontradas mediante el análisis en MASCOT. (Fuente: www.genome.jp/kegg/pathway.html)

En bifidobacterias se encuentran presentes estas rutas (Figura 22) para el catabolismo de carbohidratos junto con la vía característica de la F6PPK (Klijn *et al.*, 2005).

En su análisis proteómico Yuan *et al.*(2006) reportaron que la glucosa y la fructosa son catabolizadas por la misma vía, pero el aumento más significativo que ellos reportan es en un punto caracterizado como un elemento de perteneciente transportador tipo ABC cuando la fuente de carbono es fructosa.

En el caso del crecimiento en fructanos observamos que está presente un componente periplásmico tipo ABC del sistema de transporte de azúcares (punto BL04, el cual se encuentra aumentado), se ha reportado que en el genoma de *B. longum* algunas glicosilhidrolasas y transportadores de oligosacáridos están organizados en grupos con una arquitectura modular conservada (Schell *et al.* 2002), en los cuales se incluye este tipo de transportador junto con un regulador transcripcional tipo LacI y de esta manera el control de la expresión de los genes catabólicos se presume ocurre en respuesta a la disponibilidad de azúcares (Figura 21), en este caso los fructanos encenderían una respuesta específica para su utilización como fuente de carbono

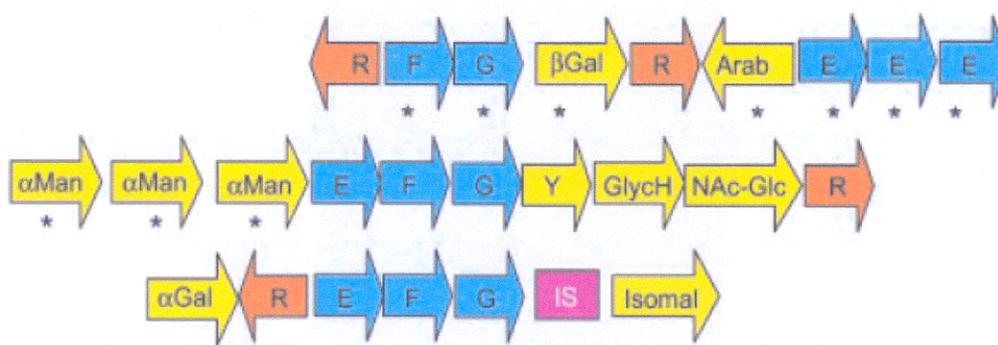


Figura 22. Grupos de genes para utilización de oligosacáridos. Los genes están representados por la flechas. IS, secuencias insertadas; F, E y R, subunidades de las permeasas tipo MalF y MalG y proteína de unión soluble MalE de los transportadores ABC; R, represor tipo LacI; Arab, arabinosidasa; β Gal, β -galactosidasa; α Gal y α Man, α galactosidasa y manosidasa; GlycH, Glicosil hidrolasa de especificidad desconocida, Isomal, Isomaltasa; NAcGlc, N-acetil glucosaminidasa; asteriscos marcan genes de reciente duplicación (adaptado de Schell *et al.* 2002).

Los resultados reflejan que cuando *B. longum* crece en fructanos estos inducen una respuesta fisiológica compleja en la cual toman parte proteínas de distintas categorías funcionales. Esta respuesta se ve reflejada en la caracterización de proteínas con distinto nivel de expresión, donde encontramos proteínas involucradas desde niveles de replicación de ADN, modificaciones posttranscripcionales, traducción y modificaciones posttraduccionales, (puntos BL13, BL08, BL12 y BL16); hasta el metabolismo de aminoácidos, síntesis de exopolisacáridos y producción de energía (puntos BL06, BL11 y BL07).

Estudios similares, a la presente investigación, realizados por Zhao *et al.* (2007) con *Pseudomonas alcaligenes* y por Uwins *et al.* (2006) con *Helicobacter pylori*, muestran que los cambios en el proteoma de estos microorganismos ocurren en respuesta o adaptación al ambiente en que se encuentren; así las alteraciones en nutrientes, temperatura y exposición a químicos, entre otras, ocasionan cambios en la expresión de proteínas.

En *B. longum* se ha estudiado el efecto de las sales biliares, a las que están naturalmente expuestos, mediante las diferencias en patrones de expresión de proteínas, igualmente se encuentran cambios en proteínas de distintas categorías, transcripción, traducción, metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, y algunas enzimas de la glicólisis y del catabolismo del piruvato. Por otra parte, se resalta las proteínas de respuesta a estrés como parte del proceso de adaptación al ambiente intestinal asegurando la supervivencia del microorganismo (Sanchez *et al.*, 2005).

VIII. CONCLUSIONES

El probiótico *Bifidobacterium longum* fue capaz de utilizar fructanos de *Agave tequilana* como fuente de carbono, esto podría significar un nuevo uso del agave independiente a la elaboración de tequila.

Los cambios observados en los geles bidimensionales muestran proteínas diferenciales, al usar fructanos como fuente de carbono. Se encontraron proteínas involucradas en el transporte, como el elemento del transportador ABC, y enzimas del catabolismo de carbohidratos, junto con proteínas con distintas categorías funcionales.

Estos cambios a nivel del proteoma junto con el cambio en las dimensiones de la bacteria, son el resultado del uso de fructanos como fuente de carbono.

Finalmente, con este trabajo se pretende aportar conocimiento, sustentado por estudios científicos, de la capacidad de *Bifidobacterium longum* para usar fructanos de *Agave*. Contribuyendo al desarrollo de alimentos funcionales, los cuales se han popularizado aumentan su demanda y valor.

VII. REFERENCIAS

1. 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.
2. Arunachalam K., Gill H.S., Chandra, R.X. 2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019), Eur J Clin Nutr 54, 263–267.
3. Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, eds. S. Salminen and A. von Wright, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, p. 1-72.
4. Ballabriga A. 2001. Nutrición en la infancia y en la adolescencia, 2a Edición, Ediciones ERGON, 625-650
5. 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.
6. Banguela A., Hernández L. 2006. Fructans: from natural sources to transgenic plants, *Biotechnología aplicada*, 23, 202-210.
7. Berkelman T., Stenstedt T. 2002. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients principles and methods, Amersham Biosciences.
8. Buddington R.K., Williams C.H., Chen S.C. Witherly S. 1996. Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects, Am J Clin Nutr, 63, 709-716.

9. Cash P. 2000. Proteomics in medical microbiology, electrophoresis, 21, 1187-1201.
10. Casiragh M.C., Canzi E., Zanchi R., Donati E., Villa L. 2007. Effects of a symbiotic milk product on human intestinal ecosystem Journal of Applied Microbiology, Online Early Articles. Published article online: 24-Jan-2007
11. Diplock A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern E.B., Roberfroid M.B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document., Br J Nutr 81 (Suppl. 1), S1–S27.
12. Van De Merwe W., Li Z.Z., Bronk B.V., Czégé J. 1997. Polarized Light Scattering for rapid observation of bacterial size changes. Biophysical journal. 73, 500-506.
13. Fandi, K., Ghazali, H., Yazid, A., Raha A. 2001. Purification and N-terminal amino acid sequence of fructose-6-phosphate phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* BB536, Lett. Appl. Microbiol, 32, 235-239.
14. FAO/WHO, 2001, joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food. Disponible en http://www.mesanderes.com/probio_reports.pdf
15. Gallaher D., Khil J. 1999. The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats, J. Nutr, 129 , 1483S-1487S.
16. García A., Galvan V. 1995. Riqueza de las familias *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México, Bol. Soc. Bot. Mex, 56, 7-24.
17. Gibson G.R. Roberfroid M. 1994. Dietary modulation of human colonic microbiota: including the concept of prebiotics, J Nutr, 125, 1401-1412.

18. Gibson G.R., Beatty E.R., Wang X., Cummings J.H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108, 975-982
19. 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.
20. Hartemink R., Kok B., Weenk G. Rombouts F. 1996. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria, *J. Microbiol. Methods*, 27, 33-43.
21. Herbert B.R., Grinyer J., McCarthy J.T., Isaacs M., Harry E.J., Nevalainen H., Traini M.D., Schulz B., Laver M., Goodall A.R., Packer J., Harry J.L., Williams K.L. 2006. Improved 2-DE of micro-organisms after acidic extraction, *Electrophoresis*, 27, 1630-1640
22. Hopkins M., Cummings J., and Macfarlane G. 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *J. Appl. Microbiol*, 85, 381-386.
23. Ishibashi N., Yamazaki S. 2001. Probiotics and safety, *Am. J. Clin. Nutr*, 73, 465S-470S.
24. Klijn A., Mercenier A. Arigoni F. 2005. Lessons from the genome of bifidobacteria, *Microbiology Reviews*, 29, 491- 509.
25. Leahy S., Higgins D., Fitzgerald G., Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria, *J. Appl. Microbiol*, 98, 1303-1315.

26. Lievin V., Peiffer I., Hudault S., Rochat F., Brassart D., Neeser J. Servin A. 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity, *Gut*, 47, 646-652.
27. Lopez M.G., Mancilla N.A., Mendoza G. 2003. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7835-7840
28. Méndez M.D. 1999. Acumulación de fructanas en *Agave tequilana* Weber var. azul cultivada en campo. Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. IPN, ENCB.
29. Perrin S., Grill J. Schneider F. 2000. Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria, *J. Appl. Microbiol*, 88, 968-974.
30. Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C. 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharmacol. Ther*, 22, 495-512.
31. Pool-Zobel B.L., Neudecker C., Domizlaff I., Ji S., Schillinger U., Rumney C., Moretti M., Vilarini I. 1996. Lactobacillus- and Bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer*, 26, 365-380.
32. Rastall R. A., Gibson G.R., Gill H.S., Guarner F., Klaenhammer T.R., Pot B., Reid G., Rowland I.R. Sanders M.E. 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications., *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 145-152.

33. Reuter G. 1963. Vergleichende Untersuchung über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl, *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung-1*, 191 486-507.
34. Ritsema T., Smeekens S. 2003. Fructans beneficial for plants and humans, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 223-230
35. Roberfroid M., 1993, Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr*, 33, 103-148.
36. Roberfroid M. 2007. Prebiotics: The concept revisited, *J. Nutr.* 137, 830S-837S
37. Sanchez B., Champomier M.C., Anglade P., Baraige F., De los Reyes C.G., Margolles A., Zagorec M. 2005. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809, *Journal of bacteriology*, 187, 5799-5808.
38. Schell M.A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M.C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R.D. Pridmore, F. Arigoni. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99,14422–14427.
39. Tissier, H., 1900, Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique), Thesis, ed. Georges Carre´ et C. Maud, University of Paris (med.)[Fr], Paris, France, pp. 253.

40. Uwins C., deitrich C., Argo E., Stewart E., Davidson I., Cash P. 2006. Growth-induced changes in the proteome of *Helicobacter pylori*, *Electrophoresis*, 27, 1136-1146.
41. Valenzuela A. G. 2003. El agave tequilero cultivo e industria de México. Editorial Mundi Prensa. Capitulo 2 ¿Qué es y cómo funciona el mezcal azul? 29-31.
42. Van der Meulen R., Avonts L., De Vuyst L. 2004. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010, *Appl. Environ. Microbiol*, 70, 1923-1930.
43. Van Laere K.M.J., Abee T., Schols H.A., Beldman G., Voragen A.G.J. 2000. Characterization of a novel β -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DMS 20083 Active towards Transgalactooligosaccharides, *Appl. Environ. Microbiol*, 6, 1379-1384.
44. 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.
45. Vijn I., Smeekens S., 1999, Fructan: more Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology*, 120, 351-359.
46. Yuan J., Zhu L., Liu X., Li T., Zhang Y., Ying T., Wang B., Wang J., Dong H., Feng E., Li Q., Wang J., Wang H., Wei K., Zhang X., Huang C., Huang P., Huang L., Zeng M., Wang H. 2006. A Proteome Reference Map and Proteomic Analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 1105- 1118.
47. Young K.D. 2003. Bacterial shape. *Molecular microbiology*. 49, 571-580.

48. Zhao B., Yeo C.C., Tan C.L., Poh C.L. 2007. Protein analysis of heat shock protein expression in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867 in response to gentisate exposure and elevated growth temperature, *Biotechnology and bioengineering* 97, 506-514.

APENDICES

A. Solución de extracción ácida

	Concentración final	Cantidad
Urea	7 M	4.2 g
Tiourea	2 M	1.5 g
CHAPS	4 % (w/v)	0.4 g
Ácido cítrico	80 mM	0.15 g
H ₂ O MilliQ		a 10 mL

B. Solución de rehidratación

	Concentración final	Cantidad
Urea	8 M	12 g
CHAPS	2 % (w/v)	0.5 g
Azul de bromofenol	0.002 %	50 µL
H ₂ O MilliQ		a 25 mL

*DTT (Ditiotrietol) e IPG Buffer o Pharmalyte son añadidos justo antes de su uso:

Adicionar 7 mg de DTT por 2.5 mL de solución de rehidratación.

0.5 % IPG Buffer (12.5 µL por 2.5 mL).

** Almacenar en alícuotas de 2.5 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		10 mL

D. Buffer de equilibrio SDS (Dodecil sulfato de sodio)

	Concentración final	Cantidad
Tris-HCl, pH 8.8	50 mM	10 mL
Urea	6 M	72.07 g
Glicerol	30% (v/v)	69 mL
SDS	2 % (v/v)	4.0 g
Azul de bromofenol	0.002 %	50 µL
H ₂ O MilliQ		a 200 mL

E. SDS 10%

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

F. Persulfato de amonio 10 %

	Concentración final	Cantidad
Persulfato de amonio	10 %	0.1 g
H ₂ O MilliQ		1.0 mL

G. SDS buffer de electroforesis

	Concentración final	Cantidad
Tris-base	25 mM	30.3 g
Glicina	192 mM	144.0 g
SDS	0.1 % (v/v)	10 g
H ₂ O MilliQ		a 200 mL

H. Agarosa al 5 %

	Concentración final	Cantidad
SDS buffer de electroforesis		100 mL
Agarosa	0.5 %	0.5 g
Azul de bromofenol	0.002 %	200 µL

I. Gel desnaturante de poliacrilamida 12%

Componente	Cantidad
Acrilamida	1.584 mL
Água	1.356 mL
Tris pH 8.8	1.0 mL
SDS 10%	40.0 µL
PSA	20.0 µL
TEMED	2.0 µL

J. Composición del medio mínimo

Componente	Cantidad*
Na ₂ HPO ₄	0.6 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
NH ₄ Cl	0.1 g
NaCl	0.05 g
MgSO ₄	0.01 g
Peptona	0.5 g
Fuente de carbono*	1 g
Cisteina	0.05 g

* Cantidades para un volumen final de 100 mL

** En el caso de fructanos se uso 2 g