

## Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

<b>TITULO</b>	Evaluación bioquímica y molecular de la capacidad hipocolesterolémica de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico		
<b>SUBTITULO</b>			
<b>AUTOR(ES)</b> Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	<b>Aragón Rojas, Stephania</b>		
<b>PALABRAS CLAVE</b> (Mínimo 3 y máximo 6)	<b>Probióticos</b>		<b>Hidrolasa de sales biliares (BSH)</b>
	<b>Disminución de colesterol</b>		
	<b>Lactobacillus</b>		
<b>RESUMEN DEL CONTENIDO</b> (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>La hipercolesterolemia es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares. Se evaluó in vitro la capacidad de disminuir el colesterol por la actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), adsorber el colesterol y la actividad de BSH en cinco cepas <i>L. fermentum</i>. BSH fue determinada por la cantidad de glicina o taurina liberadas, indicando que las cepas evaluadas hidrolizaban las sales conjugadas con taurina y glicina. Por otro lado, se determinó que el gen <i>bsh</i> en cepas <i>L. fermentum</i> se expresa a la segunda hora de crecimiento bacteriano y la actividad de la enzima BSH, medida por HPLC, inicia en el mismo momento. La cepa <i>L. fermentum</i> K73 fue la que presentó mayor potencial hipocolesterolémico.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**EVALUACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA CAPACIDAD  
HIPOCOLESTEROLÉMICA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL  
PROBIÓTICO**

**STEPHANIA ARAGÓN ROJAS**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
MAESTRIA EN DISEÑO Y GESTION DE PROCESOS  
BOGOTÁ D.C  
NOVIEMBRE 2 DEL 2012**

**EVALUACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA CAPACIDAD  
HIPOCOLESTEROLÉMICA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL  
PROBIÓTICO**

**STEPHANIA ARAGÓN ROJAS**

**Trabajo para optar por el Título de:  
Magister en Diseño y Gestión de Procesos  
Énfasis de Bioprocesos**

**DIRECTOR**

**MARÍA CLEMENTINA CUETO VIGIL**

**MSc. Ciencias Bioquímicas**

**LUIS EDUARDO DIAZ BARRERA**

**PhD. Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA**

**FACULTAD DE INGENIERIA**

**MAESTRIA EN DISEÑO Y GESTION DE PROCESOS**

**BOGOTÁ D.C**

**NOVIEMBRE 2 DEL 2012**

**NOTA DE ACEPTACIÓN:**

---

---

---

---

---

---

**Firma del jurado**

---

**Firma del jurado**

---

**Firma del jurado**

**Chía, 2, Noviembre, 2012**

## **DEDICATORIA**

Dios y Virgencita Linda, este trabajo es para y por ustedes, especialmente por haberme guiado a esta Universidad que se ha convertido en un segundo Hogar para mí.

Mamita, Papito y Nene lindo, son la piedra angular de mi vida y mi fortaleza, por ustedes estoy escribiendo estas líneas que resumen mi labor, más no alcanzan a plasmar todos los conocimientos adquiridos durante el proceso que fue cursar la Maestría en Diseño y Gestión de Procesos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y La Virgen, por guiar mí camino y presentarme a las personas indicadas de quienes aprendí académica, personal y espiritualmente cada día.

A Clementina Cueto, por todo su apoyo y confianza y, por mostrarme siempre la cara dulce y buena de la vida. La palabra GRACIAS no alcanza a expresar todo lo que siento en el corazón por las experiencias vividas.

A Luis Eduardo Díaz, muchas gracias por su compañía durante este proceso, permitirme explorar en el conocimiento y guiarme en las decisiones tomadas.

A todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron acompañándome durante este proceso.

A todos ellos, GRACIAS, porque son muestra de la obra perfecta de Dios.

## CONTENIDO

	pág.
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo general .....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MARCO REFERENCIAL.....	17
3.1. Marco teórico.....	17
3.1.1. Sales biliares .....	17
3.1.2. Probióticos con potencial hipocolesterolémico .....	19
3.1.3. Enzima hidrolasa de sales biliares .....	21
3.2. Estado del Arte.....	25
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
4.1. Aislamientos de cepas del género <i>Lactobacillus</i> .....	31
4.2. Caracterización de microorganismos con potencial probiótico <i>in vitro</i> .....	32
4.2.1. Evaluación de tolerancia a pH ácido y concentración de sales biliares .....	32
4.2.2. Determinación de la resistencia a antibióticos.....	33
4.2.3. Identificación molecular de las cepas de <i>Lactobacillus</i> .....	33
4.3. Evaluación bioquímica del potencial hipocolesterolémico.....	34
4.3.1. Evaluación cualitativa de la presencia de la enzima BSH .....	34
4.3.2. Evaluación cuantitativa por desconjugación de sales biliares.....	35
4.3.3. Adsorción de colesterol.....	36
4.4. Identificación molecular de la presencia de la enzima BSH.....	37
4.4.1. Diseño y verificación de primers .....	37
4.4.2. Secuenciación y análisis filogenético .....	37
4.5. Actividad enzimática de la BSH por HPLC .....	38

4.5.1. Extracción de sales biliares.....	38
4.5.2. Análisis por HPLC.....	38
4.6. Análisis de la expresión de la enzima BSH.....	39
4.6.1. Aislamiento del RNA Total .....	40
4.6.2. Síntesis de cDNA.....	40
4.6.3. Amplificación de los productos de cDNA.....	41
4.7. Análisis estadístico .....	41
5. RESULTADOS .....	42
5.1. Aislamiento de cepas del género <i>Lactobacillus</i> .....	42
5.2. Caracterización de microorganismos con potencial probiótico <i>in vitro</i> .....	43
5.3. Evaluación bioquímica del potencial hipocolesterolémico.....	47
5.3.1. Evaluación cualitativa de la presencia de la enzima BSH .....	47
5.3.2. Evaluación cuantitativa por desconjugación de sales biliares.....	50
5.3.3. Adsorción de colesterol.....	52
5.4. Identificación molecular de la presencia de la enzima BSH.....	53
5.5. Actividad enzimática de la BSH por HPLC .....	56
5.6. Análisis de la expresión de la enzima BSH en la cepa <i>L. fermentum</i> ATCC 9338 .	58
6. DISCUSIÓN.....	62
7. CONCLUSIONES .....	74
8. RECOMENDACIONES .....	76
9. REFERENCIAS .....	77
10. ANEXOS.....	96
10.1. Curvas de calibración para glicina y taurina .....	96
10.2. Plantillas de validación estadística, curvas de calibración para glicina y taurina..	97
10.3. Curvas de crecimiento.....	98
10.4. Curva de calibración de colesterol.....	100
10.5. Plantilla de validación estadística .....	101
10.6. Secuencias consenso <i>gen bsh</i> .....	102
10.7. Alineamiento múltiple del gen <i>bsh</i> inter e intra- especies del género <i>Lactobacillus</i> . .....	103
10.8. Comparación de medias de Tukey (SPSS 15.0).....	105
10.8.1. Cepa <i>L. fermentum</i> K72.....	105
10.8.2. Cepa <i>L. fermentum</i> K73.....	106

10.8.3. Ceba <i>L. fermentum</i> S7-2b.....	107
10.8.4. Ceba <i>L. fermentum</i> ATCC 9338.....	108
10.8.5. Ceba <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 .....	109

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Tracto gastrointestinal.....	19
Figura 2. Medio selectivo para la cepa <i>L. acidophilus</i> .....	43
Figura 3. Análisis bioinformático para la identificación molecular de la cepa S7-2b .....	46
Figura 4. Halos indicativos de actividad enzimática. cepas.....	48
Figura 5. Estandarización PCR <i>gen bsh</i> .....	54
Figura 6. Identificación molecular del <i>gen bsh</i> en las cepas con potencial probiótico.....	54
Figura 7. Filograma cepas <i>L. fermentum</i> .....	55
Figura 8. Filograma <i>gen bsh</i> en distintas especies del género <i>Lactobacillus</i> .....	56
Figura 9. Desconjugación de sales biliares durante la fase exponencial medida por HPLC. .....	57
Figura 10. Expresión génica de la enzima BSH para la cepa <i>L. fermentum</i> ATCC 9338..	59
Figura 11. Diagrama superficie de respuesta para la expresión del <i>gen bsh</i> .....	60
Figura 12. Grafica de diferentes tiempos, evaluación de la expresión enzimática en función del tiempo.....	61
Figura 13 . Curva de calibración para glicina .....	96
Figura 14. Curva de calibración para taurina .....	96
Figura 15. Curva de crecimiento cepa <i>L. fermentum</i> K 72. ....	98
Figura 16. Curva de crecimiento cepa <i>L. fermentum</i> K73. ....	98
Figura 17. Curva de crecimiento cepa <i>L. fermentum</i> S7-2b. ....	99
Figura 18. Curva de crecimiento cepa <i>L. fermentum</i> ATCC 9338. ....	99
Figura 19. Curva de crecimiento cepa <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356.....	100
Figura 20. Curva de calibración de Colesterol total.....	100

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Cepas del género <i>Lactobacillus</i> con características hipocolesterolémicas. ....	22
Tabla 2. Genes <i>bsh</i> presentes en cepas caracterizadas como probióticos .....	37
Tabla 3. Simulación de la tolerancia a jugo gástrico y sales biliares por aislamiento.....	44
Tabla 4. Antibiograma realizado a las cepas pre-seleccionadas como potenciales probióticos .....	45
Tabla 5. Diferencia entre el área del halo de actividad enzimática y el área de crecimiento de la colonia .....	49
Tabla 6. Actividad de la enzima BSH .....	51
Tabla 7. Porcentaje de adsorción del colesterol.....	53
Tabla 8. Primers específicos para el <i>gen bsh</i> de <i>L. fermentum</i> .....	53
Tabla 9 . Validación estadística: Curva de calibración glicina .....	97
Tabla 10. Validación estadística: Curva de calibración taurina.....	97
Tabla 11. Validación estadística: Curva de calibración de colesterol .....	101

## RESUMEN

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares y causa importante de muerte en varios países. Desde hace años, los alimentos que contienen bacterias ácido lácticas, han sido reconocidos por la variedad de efectos benéficos sobre la salud del consumidor como la capacidad de disminuir el colesterol sérico. Se evaluó *in vitro* la capacidad de disminuir el colesterol por la actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), la capacidad de adsorber el colesterol y la BSH por la cantidad de glicina o taurina liberadas en el medio en cinco cepas *L. fermentum* con potencial probiótico evaluadas en estudios previos y una cepa aislada de suero costeño, *L. fermentum* S7-2b. BSH fue determinada por la cantidad de glicina o taurina liberadas en el medio, indicando que las cepas evaluadas hidrolizaban las sales conjugadas con taurina y glicina. Estos resultados evidenciaron que las cepas *L. fermentum* K73 y *L. fermentum* S7-2b fueron las que más adsorbían colesterol. Por otro lado, se determinó que el gen *bsh* en cepas *L. fermentum* se expresa a la segunda hora de crecimiento bacteriano y la actividad de la enzima BSH, medida por HPLC, inicia en el mismo momento. La cepa *L. fermentum* K73 fue la que presentó mayor potencial hipocolesterolémico. A futuro, se espera evaluar la cepa *in vivo* e incorporarla en distintas matrices alimentarias para su uso industrial.

**PALABRAS CLAVES:** Probióticos, Disminución de colesterol, *Lactobacillus*, Hidrolasa de sales biliares (BSH)

## INTRODUCCIÓN

El colesterol es un componente natural de las grasas de la sangre y está presente en todas las células del cuerpo (Kimoto, Ohmomo, & Okamoto, 2002). Cuando los niveles de colesterol están altos en el torrente sanguíneo, se generan depósitos pegajosos conocidos como placa a lo largo de las paredes arteriales (hipercolesterolemia). Los altos niveles de colesterol sérico correlacionan con la incidencia de hipercolesterolemia y enfermedad cardíaca coronaria (Wang, Wu, Ng, & Shyu, 2010). Varios estudios han sugerido que la disminución del colesterol puede ser un beneficio importante para la salud, de forma que la disminución de 1% en el colesterol sérico se asocia con reducciones estimadas de 2 a 3% en el riesgo de enfermedad coronaria (Nguyen, Kang, & Lee, 2007).

Un efecto benéfico de consumo humano de bacterias ácido lácticas (BAL) es la reducción de colesterol sérico (Pereira, McCartney, & Gibson, 2003). Se ha reportado que *L. acidophilus* tiene el potencial de disminuir el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria en un 6 a 10% por reducir el colesterol sérico. Varios estudios han mostrado que especies de *Lactobacillus* son capaces de bajar los niveles del colesterol sérico y reducir la severidad de la hipercolesterolemia ya sea por su disminución total o por reducción de lipoproteínas de baja densidad LDL (Anderson & Gilliland, 1999).

Se han realizado algunos estudios de cepas bacterianas con potencial reductor de colesterol y se conocen algunos mecanismos que logran esta reducción como la desconjugación de las sales biliares gracias a la enzima hidrolasa de sales biliares (E.C. 3.5.1.24), enzima activa en muchas especies de BAL (Lye, Rusul, & Liong, 2010) y la absorción del colesterol en el lumen intestinal. Esto ocurre por el incremento en la

demanda de colesterol para la síntesis de nuevos ácidos biliares o por reducción de la solubilidad del colesterol. Algunos autores reportan la capacidad de las bacterias de incorporar a la membrana o adherir el colesterol a la superficie, haciendo que disminuya la disponibilidad para su absorción intestinal y paso a la sangre (Belviso, Giordano, Dolci, & Zeppa, 2009).

Con esta investigación se determinó la capacidad de cepas potencialmente probióticas, aisladas de matrices lácteas provenientes de productos autóctonos colombianos, como suero costeño para reducir niveles de colesterol *in vitro*. Posteriormente podrían utilizarse a nivel industrial en el diseño y desarrollo de productos alimentarios y de esta manera contribuir con la caracterización de aislamientos microbianos obtenidos de estos alimentos, y que a futuro podrían mejorar la alimentación y condiciones de salud de los consumidores.

## 1. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El informe presentado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), sobre los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) muestra en el periodo evaluado, 2005-2007, que 17 millones de personas no alcanzan los niveles nutricionales indicados según la edad; predomina el consumo de alimentos con bajo aporte nutricional y se observa una tendencia en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (diabetes, hipertensión, enfermedades coronarias, diferentes tipos de cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica) (Gregory *et al.*, 2011).

Según el Informe sobre la Situación de la Salud en Colombia (2007), del Ministerio de la Protección Social, la enfermedad cardiovascular es la causa principal de muerte, tanto en hombres como en mujeres mayores de 45 años, e incluso supera las muertes violentas o por cánceres combinados. A nivel internacional, la Organización Mundial de la Salud, en el Boletín sobre “El colesterol alto, un problema mal controlado” (Gregory *et al.*, 2011), mostró que en países desarrollados como Estados Unidos, Inglaterra, Alemania, Escocia, Japón entre otros, el 70% de la población está en riesgo de desarrollar enfermedades de origen cardiaco, las cuales se encuentran sin tratamiento siendo éste económico y de fácil acceso, razón por la cual se está promoviendo actividades de prevención, que incluyen disminuir el uso de tabaco, realizar actividad física con regularidad y consumir alimentos saludables.

Por otro lado, el tema de la reducción del hambre se enmarca en el derecho a la alimentación, reconocido en el artículo 11 del Pacto Internacional de Derechos Económicos, Sociales y Culturales. Éste documento establece que una de las funciones del Estado es el mejoramiento de los métodos de producción, conservación y distribución

de alimentos, mediante la plena utilización de los conocimientos técnicos y científicos así como la divulgación de los principios sobre nutrición (Kofi, 2005). El consumo de alimentos ricos en lípidos, especialmente colesterol y ácidos grasos saturados, tiene un papel predominante en el aumento de las enfermedades coronarias (Belviso, *et al.*, 2009) y por ello la demanda de los consumidores por alimentos con menor cantidad de estos compuestos y con propiedades saludables aumenta cada día. Bajo este marco, el desarrollo de alimentos funcionales, como los enriquecidos con probióticos, constituyen una alternativa alimentaria, aportando beneficios sobre la salud del consumidor.

El presente proyecto de investigación evaluó dos mecanismos mediante ensayos *in vitro*, por los cuales cepas de *Lactobacillus* con potencial probiótico pueden reducir los niveles de colesterol sérico y de esta forma responder a la pregunta global:

¿Tienen las cepas de *Lactobacillus* estudiadas la capacidad de desconjugar sales biliares y adsorber el colesterol *in vitro*?

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para desconjugar sales biliares y adsorber el colesterol *in vitro* como medida de su efecto hipocolesterolémico.

### 2.2. Objetivos Específicos

- ▶ Seleccionar especies del género *Lactobacillus* con potencial probiótico provenientes de matrices lácteas para evaluar el potencial hipocolesterolémico.
- ▶ Determinar la cepa con mayor actividad enzimática según la selectividad hacia las sales biliares en el hombre.
- ▶ Evaluar la respuesta de la expresión génica del *gen bsh* y su funcionalidad mediante técnicas moleculares y bioquímicas.
- ▶ Evaluar la capacidad de bacterias ácido lácticas para adsorber el colesterol en medios *in vitro* como medida de su potencial hipocolesterolémico.

### **3. MARCO REFERENCIAL**

#### **3.1. Marco teórico**

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos ejercen un efecto benéfico sobre el individuo, como el fortalecimiento del sistema inmune, reducción de las reacciones alérgicas e inflamación, además de disminuir los niveles séricos de colesterol. El catabolismo del colesterol está dado por la síntesis de ácidos biliares que al conjugarse con los aminoácidos taurina y glicina forman las sales biliares. Las sales biliares son desconjugadas en el intestino delgado por la acción de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), secretada por los microorganismos probióticos. La disminución de las sales biliares permite la formación de nuevas sales para mantener constante su concentración en el organismo. A continuación se presenta una profundización de los procesos mencionados anteriormente.

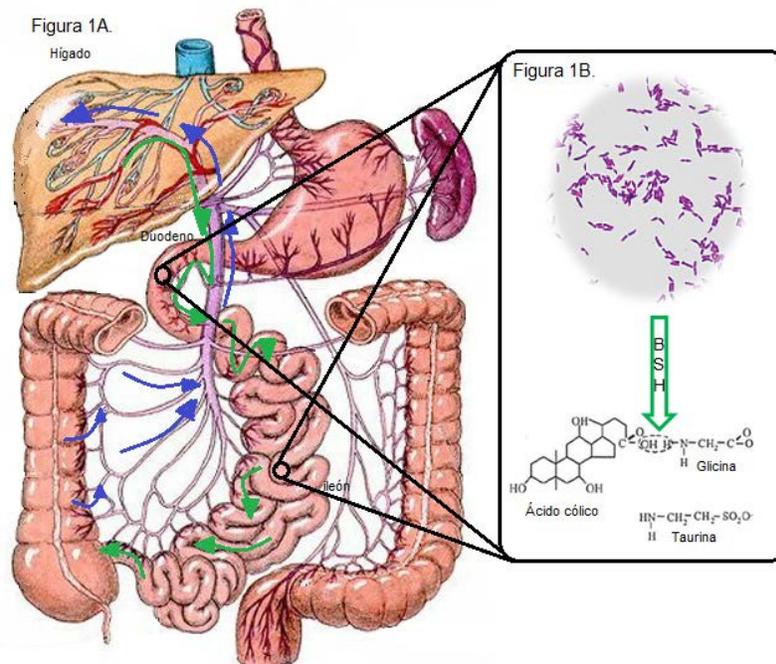
##### **3.1.1. Sales biliares**

Las sales biliares (SB) constituyen uno de los principales compuestos de la bilis junto con el colesterol, fosfolípidos y la biliverdina. Se sintetizan en los hepatocitos pericentrales, como primer paso para la ruta catabólica del colesterol y se almacenan en la vesícula biliar liberándose al duodeno después de la ingesta de alimentos (Begley, Hill, & Gahan, 2006; Herrema *et al.*, 2010). Tienen actividad antibacteriana, por disolver las membranas celulares, emulsionar y solubilizar los lípidos para ser absorbidos en el íleon y juegan un papel importante en la regulación del metabolismo del colesterol y de la glucosa en los seres humanos (Begley, Sleator, Gahan, & Hill, 2005).

Las SB son moléculas con un núcleo esteroide con grupos hidroxilos y una cadena lateral que termina con un grupo carboxilo. Se forman a partir de la conjugación de los ácidos biliares primarios con los aminoácidos de glicina y taurina, siendo las sales más abundantes en el organismo glucolato y taurocolato de sodio (Liong & Shah, 2005). Son anfipáticas y permiten la solubilización de los lípidos por medio de la formación de micelas mixtas presentes en el intestino delgado, íleon, para facilitar su absorción (Corzo & Gilliland, 1999).

La concentración de sales biliares en el organismo se mantiene gracias a la circulación enterohepática. Durante la circulación enterohepática se secretan 4.0 g de sales biliares dos veces durante cada comida al duodeno, cerca de 6-8 veces durante el día, con el objetivo de formar micelas lipídicas producto de la digestión. Durante el tránsito intestinal, el 90-95% de las sales secretadas son absorbidas por difusión pasiva o transporte activo en el íleon terminal y retornadas al hígado por circulación portal. En el hígado, las sales biliares pasan a través de la membrana sinusoidal y luego por el canículo biliar de los hepatocitos, aquí concluye la circulación enterohepática (Figura No. 1A). Cada molécula de sales biliares puede completar el ciclo hígado-intestino entre 4-12 veces por día. Debido a esta eficiente recirculación, sólo una pequeña cantidad de sales se deriva de nueva biosíntesis, dado que en los hepatocitos, el nivel de sales es re-establecido por la degradación del colesterol, y éste es nuevamente secretado por circulación enterohepática al intestino delgado (Jones, Chen, Ouyang, Metz, & Prakash, 2004). Durante su tránsito por el intestino, entre el 5 y 10% de las sales biliares son desconjugadas por la acción de la enzima hidrolasa de sales biliares (Jiang *et al.*, 2010), producida intracelularmente por los microorganismos pertenecientes a la flora intestinal, el

ser humano no es capaz de producir la enzima (Cardona, Vanay, Midtvedt, & Norin, 2000; Martoni *et al.*, 2007; Ridlon, Kang, & Hylemon, 2006) (Figura No. 1B).



**Figura 1.** Tracto gastrointestinal. **Figura 1-A.** Circulación enterohepática, las flechas verdes indican la circulación de las sales biliares desde el hígado a la vesícula biliar y termina en el intestino; las flechas azules indican el recorrido de las sales una vez son adsorbidas en el intestino. En el intestino delgado las sales son desconjugadas a ácido biliares por acción de la enzima BSH, **Figura 1-B.** Imagen modificada Ridlon *et al.*, 2006.

### 3.1.2. Probióticos con potencial hipocolesterolémico

Los microorganismos vivos contenidos en productos fermentados han sido tradicionalmente usados para mantener el equilibrio intestinal. Tal utilización de microorganismos vivos para mejorar la salud del hospedero es la base del concepto de probiótico. Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002). Esta definición sugiere que la seguridad y eficacia de los probióticos ha de demostrarse para

cada cepa y producto. Las cepas más utilizadas como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Kailasapathy & Chin, 2000).

Para producir beneficios terapéuticos, debe estar presente un número suficiente de microorganismos viables durante todo el período de vida útil del producto. La base para evaluar la eficacia de los probióticos en los seres humanos requiere la comprensión de cepas probióticas, cada una de ellas es única y diferente. Por lo tanto, las propiedades de la cepa y las características deben estar bien definidas, y los estudios que utilizan otras cepas estrechamente relacionadas, no se pueden extrapolar o apoyarse unos a otros.

En general, los probióticos no colonizan el tracto intestinal humano de forma permanente, pero algunas cepas son capaces de colonizarlo de forma transitoria. Se han reportado bacterias probióticas que modulan las respuestas inmune locales y sistémicas (Isolauri, Rautava, Kalliomäki, Kirjavainen, & Salminen, 2002). Las bacterias probióticas también pueden contrarrestar los procesos inflamatorios mediante la estabilización de la microbiota sana y mejorar así la permeabilidad en el intestino. Además de influir en la microbiota intestinal y en el sistema inmunológico, se han propuesto otros mecanismos de acción probiótica, como es la inhibición de patógenos por competencia por los nutrientes y sitios de fijación o por la producción de sustancias antimicrobianas, la reducción de los niveles de colesterol a través de desconjugación de las sales biliares, uniones a toxinas y carcinógenos para impedir su absorción (Isolauri, *et al.*, 2002).

Son tres los mecanismos por los cuales los microorganismos intervienen en el metabolismo del colesterol, dos de ellos de forma directa y el tercero de forma indirecta: i) conversión de la molécula de colesterol a coprostanol, haciéndola in-absorbible en el

intestino, éste es poco común y se ha reportado en *E. coprostanoligenes* de aislamiento de conejo (Cardona, *et al.*, 2000); ii) adsorción de la molécula de colesterol para fortalecimiento de la membrana celular (Kimoto, *et al.*, 2002); y iii) producción de la enzima hidrolasa de sales biliares, que actúa de forma indirecta sobre el metabolismo del colesterol al aumentar la desconjugación de sales biliares (Corzo & Gilliland, 1999b).

Ésta última ha sido la más estudiada debido a que no solo brinda efectos benéficos sobre el hospedero sino que es un mecanismo de sobrevivencia para el microorganismo (Huijghebaert, Mertens, & Eyssen, 1982); la producción de la enzima facilita la entrada de colesterol hacia la membrana celular fortaleciéndola (Dambekodi & Gilliland, 1998); y es considerada única en especies que colonizan el tracto gastrointestinal como mecanismo de evolución (Jones, Begley, Hill, C. G. M. Gahan, & J. R. Marchesi, 2008).

### **3.1.3. Enzima hidrolasa de sales biliares**

La enzima Hidrolasa de Sales Biliares hace parte del metabolismo de las sales biliares en humanos y depende de la microflora intestinal. Cuando la sal biliar está desconjugada aumenta su excreción a través de las heces. La enzima BSH cataliza la hidrólisis de ácidos biliares conjugados a simples residuos de aminoácidos y ácidos biliares (Sadaf, 2009). La BSH ha sido aislada de varias cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Enterococcus* (Corzo & Gilliland, 1999).

La BSH pertenece a la familia de las coloilglicinohidrolasas, familia a la cual también pertenecen las penicilinamidases (Kumar *et al.*, 2006). Ha sido clasificada como hidrolasa nucleofílica N-terminal (Ntn) con un residuo de Cys en el N-terminal. Éste Cys-1 se convierte en el centro catalítico después de remover una metionina por procesos

autoproteolíticos lo cual es común en la superfamilia de las N-terminal hidrolasas (Oinonen & Rouvinen, 2000). El grupo tiol de Cys-1 ha mostrado ser esencial para la actividad catalítica. Los amino ácidos Asp-20, Tyr-82, Asn-175 y Arg-228 se encuentran altamente conservados en todas las secuencias reportadas, sugiriendo que constituyen una parte fundamental en la funcionalidad de la enzima.

Existe una alta variabilidad fenotípica y genómica de la BSH entre géneros y entre especies. El objeto de estudio en este proyecto es el género *Lactobacillus*, razón por la cual solo se hará referencia a las especies de dicho género. Las especies más estudiadas han sido *L. acidophilus* y *L. plantarum* y son también las que presentan más características probióticas (Tabla No. 1) (Elkins, Moser, & Savage, 2001; Lambert, Bongers, De Vos, & Kleerebezem, 2008; McAuliffe, Cano, & Klaenhammer, 2005).

**Tabla 1.** Cepas del género *Lactobacillus* con características hipocolesterolémicas.

Cepa	Modelo de estudio	Objeto de estudio	Referencia
<i>L. fermentum</i>	<i>In vitro</i> -F	Adsorción de colesterol y desconjugación de TCA	Zeng, Pan, & Zhou, 2011
	In vivo-Modelo murino	Disminución de colesterol sérico	Cardona, <i>et al.</i> , 2000; Tannock, Dashkevich, & Feighner, 1989; Wang, Wu, Ng, & Shyu, 2010; Xie <i>et al.</i> , 2011
	<i>In vitro</i> , HPLC, P	Desconjugación de sales biliares	Moser & Savage, 2001; Pereira, <i>et al.</i> , 2003
	<i>In vitro</i> -N	Desconjugación de TCA y GCA	Jiang, <i>et al.</i> , 2010
<i>L. acidophilus</i>	In vivo-Modelo avícola	Disminución de colesterol sérico	Salarmoini & Fooladi, 2011
	In vivo- Modelo porcino	Disminución de colesterol sérico	Liong, Dunshea, & Shah, 2007
	<i>In vitro</i>	Adsorción de colesterol	Gokavi, Zhang, Huang, Zhao, & Guo, 2005; Huang & Zheng, 2010
	In vivo- Modelo humano	Disminución de colesterol sérico	Anderson & Gilliland, 1999; Andrade & Borges, 2009; Fukushima, Yamada, Endo, & Nakano, 1999; Kiessling, Schneider, & Jahreis, 2002; Ooi, Ahmad, Yuen, & Liong, 2010; Schaafsma, Meuling, van Dokkum, & Bouley, 1998
	In vivo-Modelo	Disminución de	Chiu, Lu, Tseng, & Pan,

	murino	colesterol sérico y hepático	2006
	<i>In vitro</i> -N, HPLC	Adsorción de colesterol y desconjugación de sales biliares	Corzo & Gilliland, 1999a, 1999b; Lye, Rusul, & Liong, 2010 ; Liong & Shah, 2005; Young, Geun, Kwang, Young, & Hyun, 2003
	<i>In vitro</i> -N y P	Desconjugación de TCA y GCA; Expresión génica	Oh <i>et al.</i> , 2008
	<i>In vitro</i> - P	Actividad cualitativa de la enzima BSH; Identificación molecular	McAuliffe, <i>et al.</i> , 2005
	<i>In vitro</i> -N	Desconjugación de TCA y GCA Comparación génica	Jiang, <i>et al.</i> , 2010
<i>L. plantarum</i>	<i>In vitro</i> -Microarreglos	Expresión <i>gen bsh</i>	Duary, Batish, & Grover, 2012
	<i>In vitro</i>	Vector del <i>gen bsh</i> para usos industriales	Yin <i>et al.</i> , 2011
	In vivo-Modelo murino	Disminución de colesterol sérico	Fazeli & Moshtaghian, 2010; Jeun <i>et al.</i> , 2010; (Kumar, Grover, & Batish, 2011; R. Kumar, S. Grover, & V. Batish, 2011); Xie, <i>et al.</i> , 2011
	<i>In vitro</i> -HPLC; TNBS	Estudio genético y funcional	Chul-Cyu, Cho, Chai, Ha, & Shin, 2006 ; M. L. Jones, <i>et al.</i> , 2004; Lambert, <i>et al.</i> , 2008; Lambert, Bongers, & Kleerebezem, 2007; Martoni, <i>et al.</i> , 2007; Smet, Van Hoorde, Saeyer, Vande Woestyne, & Verstraete, 1994
	<i>In vitro</i>	Adsorción de colesterol	Gokavi, <i>et al.</i> , 2005
	<i>In vitro</i> -N, P	Desconjugación de TCA y GCA Comparación génica	Jiang, <i>et al.</i> , 2010; Kumar, Grover, Mohanty, & Batish, 2010)
<i>L. rhamnosus</i>	<i>In vitro</i> -N, P	Desconjugación de TCA y GCA	Gulgez Gokce, Mehmet, & Aslim, 2011
	In vivo-Modelo murino	Desconjugación de sales biliares	Cardona <i>et al.</i> , 2000
<i>L. buchneri</i>	In vivo-Modelo murino; <i>In vitro</i> -N, P	Suministro vía oral: encapsulación	Sridevi, Vishwe, & Prabhune, 2009
<i>L. johnsonii</i>	<i>In vitro</i> -P	Desconjugación de TCA, GCA, TDCA	Moser & Savage, 2001, Elkins, <i>et al.</i> , 2001
	In vivo- Modelo porcino	Disminución de niveles de colesterol sérico	Du Toit <i>et al.</i> , 1998
<i>L. casei</i>	<i>In vitro</i> -N	Adsorción de colesterol y desconjugación de sales biliares	(Lye, Rusul, <i>et al.</i> , 2010); Liong & Shah, 2005
<i>L. paracasei</i> Sub sp. <i>paracasei</i>	In vivo-Modelo murino	Disminución de colesterol sérico y hepático	Chiu, <i>et al.</i> , 2006
	<i>In vitro</i>	Adsorción de colesterol	Gokavi, <i>et al.</i> , 2005
<i>L. gasseri</i>	<i>In vitro</i> -N, P	Desconjugación de TCA y GCA	Jiang, <i>et al.</i> , 2010
<i>L. gallinarum</i>	<i>In vitro</i> -N	Desconjugación de TCA y GCA	Jiang, <i>et al.</i> , 2010
	In vivo- Modelo avícola: <i>In vitro</i> -HPLC	Adsorción de colesterol y desconjugación de sales biliares	Ramasamy, Abdullah, Wong, Karuthan, & Ho, 2010
<i>L. helveticus</i>	<i>In vitro</i> -N	Desconjugación de TCA y GCA	Jiang, <i>et al.</i> , 2010
<i>L. bulgaricus</i>	<i>In vitro</i> -N	Adsorción de colesterol	Lye, <i>et al.</i> , 2010

		y desconjugación de sales biliares	
<i>L.salivarius</i>	<i>In vitro</i> -P	Presencia de BSH	Guo, Kim, Nam, & Park, 2010
	<i>In vitro</i> -N	Desconjugación de sales biliares, expresión génica	Fang <i>et al.</i> , 2009
<i>L. reuteri</i>	<i>In vitro</i> -P	Presencia de BSH	Guo, <i>et al.</i> , 2010)
	<i>In vitro</i> -HPLC	Microencapsulación; Desconjugación de sales biliares	Martoni, Bhatena, Urbanska, & Prakash, 2008
	In vivo- Modelo porcino	Disminución niveles de colesterol	Du Toit <i>et al.</i> , 1998
	<i>In vitro</i> -Modelo murino	Disminución de las sales biliares intestinales	Tannock, <i>et al.</i> , 1989
	In vivo- Modelo avícola: <i>In vitro</i> -HPLC	Adsorción de colesterol y desconjugación de sales biliares	Ramasamy, <i>et al.</i> , 2010

F: Técnica colorimétrica furfuraldehído, N: Técnica colorimétrica ninhidrina, P: Actividad de BSH en placa, TNBS: Técnica colorimétrica trinitrofenil-benceno sulfonato

Elkins (2001) propone que la diversidad entre BSH se debe a que existe una transferencia horizontal, en su estudio secuenció el operón de *L. johnsonii* 100-100, en donde se observa que el operón de la BSH contiene: i) un locus, *cbshb*, que posee tres genes relacionados con la función de hidrólisis y de transporte; ii) el locus *cbsha* que codifica otra BSH que no está relacionada con la desconjugación de las sales; iii), dos genes *cbsT1* y *cbsT2* altamente homólogos son facilitadores para “captar” los ácidos biliares conjugados (Elkins & Savage, 1998). Al comparar estos genes con *L. acidophilus* se puede decir que no se encuentran conservados entre especies, especialmente *cbshb*, *cbsT1* y *cbsT2*, sugiriendo de esta manera que se transmiten horizontalmente y solo entre cepas provenientes de aislamientos humanos. Hasta la fecha solo se ha secuenciado el operón completo de la BSH en *L. johnsonii* (Elkins & Savage, 1998), en donde se han identificado no solo los genes responsables de la síntesis de las proteínas sino que se han identificado los genes que codifican a las proteínas transportadoras y promotoras del gen.

En *L. acidophilus* se han identificado dos genes responsables de la desconjugación de las sales, *bsha* y *bshb*, no son parte constitucional del genoma, por lo cual se sugiere han sido transferidos de forma horizontal, soportando la hipótesis de Elkins (1998, 2001).

Ambos genes codifican la síntesis de dos BSH que tienen distintas especificidades por el sustrato. El *gen bsha* codifica la enzima BSHA, la cual tiene actividad sobre los núcleos esteroideos de los ácidos biliares conjugados, desconjugando tanto sales de glucolato como de taurocolato, mientras la especificidad de *bshb* está determinada por la presencia de taurina en la estructura de la sal biliar (McAuliffe, *et al.*, 2005).

En las especies de *L. plantarum* se han identificado cuatro genes que codifican para cuatro proteínas diferentes, *bsh1*, *bsh2*, *bsh3* y *bsh4*. Cada uno de ellos presenta homologías para diferentes especies de *Lactobacillus*, pero no se ha observado una especie con la cual comparta homología completa, por ejemplo: *bsh1* es altamente homólogo con *bsh* de *Enterococcus faecalis*, *bsh2* y *bsh4* presentan similitud con el reportado para *L. brevis*, y *bsh3* presenta secuencias similares entre *L. sakei* y *L. brevis*. En cuanto a especificidad de sustrato, BSH1, BSH3 y BSH4 presentan alta afinidad por las sales de glucolato sobre las sales de taurocolato. La enzima BSH1 es la que presenta mayor actividad catalítica, confiriéndosele a ésta enzima la gran capacidad que posee *L. plantarum* para desconjugar sales biliares frente a otras especies (Lambert, *et al.*, 2008).

De las especies menos estudiadas genótipicamente se encuentra *L. fermentum*, el 1 de abril del 2011 y 23 de octubre del 2012, se subió al GenBank la secuencia del *gen bsh* (N° de acceso: HM036119.1 y JX648296.1 respectivamente), la cual no presenta homología con ninguna de las secuencias reportadas actualmente.

### **3.2. Estado del Arte**

En la década de 1970 se inician estudios sobre la acción de la microflora intestinal en la desconjugación de las sales biliares caracterizándose esta función en cepas del género

*Enterococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides*. Se establece que dicha reacción se da en condiciones anaeróbicas y a pH de 5.0-6.0 (Aries & Hill, 1970). El mecanismo empleado por los microorganismos es la síntesis de enzimas que catalizan los grupos hidroxilo del ácido cólico (Aries & Hill, 1970).

En 1983 se nombra a la enzima como Hidrolasa de Sales Biliares (Bile Salt Hydrolase BSH) y se caracteriza como propia de la microbiota intestinal, puesto que su presencia persiste en aislamientos provenientes de heces fecales (Masuda & Oda, 1983). Tannock, Dashkevicz y Feighner, en 1989, demostraron que el género *Lactobacillus* predomina en la microflora intestinal de ratón y es el principal responsable de la regulación de sales biliares en cada segmento del intestino delgado. Dashkevicz y Feighner en el mismo año, desarrollaron el primer medio de cultivo para *Lactobacillus* que permite identificar de manera cualitativa la actividad enzimática (Dashkevicz & Feighner, 1989; G. W. Tannock, *et al.*, 1989).

Finalizando la década de los 80, ya se había purificado y caracterizado la BSH de *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragiles*, pero fueron Lundeen y Savage (1990) quienes purificaron y caracterizaron por primera vez la BSH de *Lactobacillus spp.* 100-100 por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), mostrando mayor especificidad a glucolato que a taurocolato de sodio sugiriendo la presencia de dos tipos de enzima, BSH-A y BSH-B. Dos años más tarde, Lundeen y Savage, caracterizaron cuatro isoformas de la enzima, BSH-A, BSH-B, BSH-C, BSH-D, cada una tenía una Vmax diferente, siendo BSH-D la de menor velocidad y por medio de Western Blot, caracterizaron subunidades distintas para cada una de ellas. Meses más tarde, postularon que la actividad de la enzima es intracelular y requiere de un factor estimulador

dependiente de la concentración de sales de biliares presentes en el medio (Lundeen & Savage, 1990; Lundeent & Savage, 1992)

En 1992, Christiaens H, Leer J, Pouwels H, y Verstraetel W, secuenciaron el gen que codifica BSH en *Lactobacillus plantarum* cepa 80, concluyendo que presenta alta homología con el gen que codifica la penicilin V amidasa en el género *Bacillus*, y con el gen colicina hidrolasa (cbh), sólo que éste desconjuga no solo el taurocolato de sodio, sino el glucolato de sodio (Christiaens, Leer, Pouwels, & Verstraete, 1992 ). Entre 1994 y 1995, Tannock y colaboradores, estudian la función de la enzima hidrolasa en ratón concluyendo que el proceso de colonización de la flora intestinal no se ve influenciado directamente por aquellos microorganismos productores de BSH (Bateup, McConnell, Jenkinson, & Tannock, 1995; Tannock, Tangerman, Van Schaik, & McConnell, 1994). En 1995 inician estudios sobre la flora microbiana en el hombre y se concluye que el género *Lactobacillus* es el más predominante en el intestino delgado, es altamente tolerante a las sales biliares pero la tolerancia no está directamente relacionada con la desconjugación de las sales biliares, puesto que varias de las cepas aisladas no presentaban esta propiedad (Thornton *et al.*, 1995). En el 2000, Tannock publica que en el intestino delgado se presenta una agregación espontánea sobre la membrana del género *Lactobacillus* de ácido y/o sales cólicas cuando aumenta el pH y posteriormente se presenta la desconjugación de las sales, sugiriendo que parte de la función de estos microorganismos es la regulación del pH intestinal (Kurdi *et al.*, 2000).

Elkins y Savage, en 1998, clonaron la región donde posiblemente se encontraba todo el gen codificante de BSH en *Lactobacillus sp. 100-100*, el fragmento de clonación era de

2700 pb y era el codificante para los dos péptidos a y b que dan origen a las cuatro isoformas que se conocen de la enzima (Elkins & Savage, 1998).

Tanaka y colaboradores inician en 1998, la caracterización de la flora microbiana con actividad analizando 300 cepas de las cuales 273 poseen actividad BSH característica de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Tanaka, Doesburg, Iwasaki, & Mierau, 1999). En el 2000, caracterizan molecularmente el operón *bsh* en el género *Bifidobacterium*, el cual es similar al reportado para *Lactobacillus plantarum* por Christiaens en 1992, la molécula madura presenta el sitio activo en Cys-1 (primer amino ácido) (Tanaka, Hashiba, Kok, & Mierau, 2000).

Corzo y Guilliland en 1999 (Corzo & Gilliland, 1999a), aíslan *L. acidophilus* a partir de heces humanas encontrando que la actividad de la enzima es intracelular y presenta mayor afinidad para desconjugar glucolato que taurocolato de sodio (Corzo & Gilliland, 1999a); en el 2005, McAuliffe, demuestra que son dos genes que codifican la BSH, *bsha* y *bshb*, *bsha* codifica la enzima que es capaz de desconjugar las sales de glucolato y taurocolato, y, *bshb* codifica la enzima que desconjuga exclusivamente sales de taurocolato (McAuliffe, *et al.*, 2005). Pereira en 2003, estudia la actividad de la enzima en *L. fermentum*, indicando que presenta especificidad por desconjugar sales de taurocolato de sodio y probablemente no presenta actividad frente a glucolato de sodio (Pereira, *et al.*, 2003).

Paralelo a estos estudios, se da el fenómeno de los microorganismos probióticos, los cuales presentan múltiples beneficios sobre la salud, fortalecen el sistema inmune, mejoran la motilidad intestinal y reducen el colesterol sérico, entre otros. Por lo anterior,

los estudios no solo se enfocan en caracterizar la funcionalidad de la enzima en múltiples cepas, sino en su aprovechamiento para mejorar la salud del consumidor.

En el 2000, Taranto y colaboradores, suministran en ratones con hipercolesterolemia inducida, dosis de *L. routui* (productora de BSH), donde se observó que mientras hubo permanencia de la cepa en el intestino habían disminuido en un 17% las lipoproteínas de alta y baja densidad (Taranto, Sesma, & Valdez, 1999). En 2004 Jones, microencapsula con 10% de alginato la cepa de *L. plantarum 80* (productora de BSH), con el objetivo de ser dosificada en un futuro como tratamiento preventivo para enfermedades de origen cardiovascular (M. L. Jones, *et al.*, 2004). Martoni en 2008, retoma el trabajo de Jones, y a las esferas de alginato las somete a las distintas condiciones del tracto digestivo, simulando éste por medio del diseño de una serie de biorreactores en serie, mostrando que la microcápsula de alginato disminuye su diámetro cuando atraviesa el pH ácido del estómago. Jones B, y colaboradores en el 2008, realizan un estudio metagenómico en donde postulan que la BSH hace parte de la evolución de los microorganismos de la flora intestinal como parte de su proceso de adaptación a las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal (Jones, Begley, Hill, Gahan, & Marchesi, 2008 ; Martoni, *et al.*, 2008).

Son muy pocos los estudios sobre la capacidad de adsorber el colesterol de los microorganismos, puesto que éste es un proceso físico y se ve limitado por las necesidades de fortalecimiento de la membrana dadas por la adversidad del medio, (Dambekodi & Gilliland, 1998; Kimoto, *et al.*, 2002), razón por la cual se hace mayor énfasis en el estudio de la producción enzimática, aun así, microorganismos con ambas capacidades tendrían un mayor efecto sobre los niveles de colesterol del hospedero, puesto que se vería tratado por dos mecanismos complementarios.

El estudio sobre el potencial hipocolesterolémico de cepas con características probióticas provenientes de aislamientos humanos, constituye una alternativa para las personas que debido a niveles altos de colesterol sérico se encuentran en riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Mediante este estudio se pretende aportar al conocimiento de cepas aisladas de matrices lácteas y de productos autóctonos colombianos como el suero costeño, en cuanto a la actividad enzimática de la BSH y la capacidad de adsorber el colesterol, hasta ahora inexistentes en el país.

## 4. DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1. Aislamientos de cepas del género *Lactobacillus*

Se realizaron aislamientos de cepas del género *Lactobacillus* a partir de tres matrices lácteas (9 muestras de suero costeño, 2 muestras de queso Paipa y 3 muestras de leche cruda), provenientes de Cartagena, Neiva, Municipio de Cota-Cundinamarca y Bogotá D.C., según la metodología propuesta por Cueto y colaboradores (Cueto, García, Garcés, & Cruz, 2007).

Los aislamientos se realizaron en medio agar MRS enriquecido para *L. acidophilus* con: 1 g/L de almidón, 1% D-sorbitol, NaCl 5 g/L, L-cisteína 0.5 g/L, clindamicina 500 µg/100mL y verde de bromocresol 0.2% (p/v) que fueron filtrados y adicionados al medio después del periodo de esterilización (Darukaradhya, Phillips, & Kailasapathy, 2006). Adicionalmente, se estudiaron cinco cepas con potencial probiótico de *Lactobacillus fermentum* (*Lactobacillus fermentum* 1-1, K11, K72, K73, y K75) aisladas en estudios anteriores (Acuña, 2009) y conservadas en el cepario de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de La Sabana. Como controles durante los ensayos se utilizaron las cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Liong & Shah, 2005) y *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 (Moreira *et al.*, 2005).

A todas las cepas con potencial probiótico estudiadas se les realizó curvas de crecimiento por densidad óptica utilizando equipo Bioscreen C (OyGrowth Curve Ab Ltd).

## **4.2. Caracterización de microorganismos con potencial probiótico *in vitro***

La caracterización *in vitro* de los aislamientos como potenciales probióticos se realizó según las directrices descritas por la FAO (2002): tolerancia a pH ácido, resistencia a sales biliares, sensibilidad a antibióticos e identificación de la especie por técnicas moleculares.

### **4.2.1. Evaluación de tolerancia a pH ácido y concentración de sales biliares**

Para evaluar la resistencia de las cepas aisladas a valores de pH ácido se tomaron 100 µL del cultivo activado y se inocularon en caldo MRS a pH 2.0 ajustado con HCL 1M y se incubó por 2h a 37°C. Se realizó el conteo de las células viables al inicial y finalizar el ensayo mediante la técnica de recuento en placa (Guo, *et al.*, 2010).

Para determinar la resistencia a sales biliares se tomaron 100 µL del cultivo fresco y se inocularon en caldo MRS enriquecido con 0,3% sales biliares (Sigma B8756), se incubaron por 2h a 37°C, así mismo, se realizó un recuento inicial y final del cultivo para evaluar viabilidad celular (Lin, Hwang, Chen, & Tsen, 2006). El porcentaje de supervivencia fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$(\%) = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100$$

Donde N1 representa el total de células viables después del tratamiento y N<sub>0</sub> el número inicial microorganismos inoculados (Bao *et al.*, 2010). Cada ensayo se realizó por triplicado.

#### **4.2.2. Determinación de la resistencia a antibióticos**

Se empleó la prueba de difusión agar recomendada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards. Las cepas evaluadas fueron cultivadas en caldo MRS a 37°C durante 8 h; enseguida se recogieron las células por centrifugación y se ajustó la turbidez al tubo de 0.5 de la escala de McFarland en solución salina estéril. Posteriormente, se tomaron 500 µL y se sembraron en superficie en placas de agar Muller Hinton y se distribuyeron con un hisopo estéril. Los discos (OXOID-Antimicrobial Susceptibility Test Discs) impregnados con diferentes concentraciones de antibióticos fueron ubicados con pinza estéril en la superficie del agar inoculado, se utilizaron los siguientes antibióticos: cefoxitin (30µg), vancomicina (30µg), amoxicilina (10µg), gentamicina (10µg), eritromicina (15µg), norfloxacin (10µg), rifampicina (5µg), penicilina G (10µg), tetraciclina (30µg), metronidazol (5µg), ácido nadilixico (30µg), clindamicina (2µg), cloramfenicol (30µg), ampicilina (10µg). Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y luego se determinó el diámetro de inhibición en mm (Ortua *et al.*, 2007).

#### **4.2.3. Identificación molecular de las cepas de *Lactobacillus***

La extracción del ADN bacteriano se realizó con el Kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation (Mo BioLaboratories) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se amplificó la región V2-V3 del gen 16S rRNA (ácido ribonucleico ribosomal) por PCR, empleando los siguientes primers: Forward: 27 F: 5`- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`, Reverse: 787 R: 5`CTACCAGGG TATCTAAT- 3` (Woo, Fung, Lau, & Yuen, 2002; Woo *et al.*, 2003) pues proporciona la información necesaria para distinguir género y especie. El proceso de amplificación se realizó en el equipo Icyler (BioRad), y se empleó el siguiente programa: 94°C por 2 min, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, y 1 min a 72°C y una extensión final a 72°C por 2min. La mezcla de PCR se preparó adicionando Buffer 10x (Bioline), MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Bioline), mix dNTPs 200mM (Bioline), Primer Forward

100nM 0.3  $\mu$ L, Primer Reverse 100 nM 0.3  $\mu$ L, Taq 1.25U (Bioline) y 1-2  $\mu$ L de ADN. Las muestras amplificadas se corrieron en gel de agarosa a 1.5% y los amplímeros fueron visualizados en el fotodocumentador Quantityone (BioRad) por la presencia de una banda de 700 - 800 pb. Estos amplímeros fueron purificados, secuenciados y analizados bioinformáticamente mediante los software CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **4.3. Evaluación bioquímica del potencial hipocolesterolémico**

La caracterización del potencial hipocolesterolémico se realizó mediante los ensayos de evaluación cualitativa de la presencia de la enzima de BSH, evaluación cuantitativa por desconjugación de sales biliares y adsorción de colesterol.

#### **4.3.1. Evaluación cualitativa de la presencia de la enzima BSH**

La evaluación cualitativa se realizó mediante la técnica reportada por Du Toit, *et al.*, 1998 en la cual, filtros estériles de 0.6 mm fueron impregnados con cepas crecidas en caldo MRS durante 24h y colocados en placas de agar MRS suplementado con 0,5% (P/V) ácido de sodio taurodeoxicolato ácido de sodio (TDCA, SigmaT0875-5G), taurocolato de sodio (TCA, SigmaT4009-5G), y glucolato de sodio (GCA, SigmaG7132-5G), y 0,37 g/L de CaCl<sub>2</sub>. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 h, luego de este tiempo se determinó el área de los halos de crecimiento y de actividad enzimática. La actividad enzimática real se calculó por la diferencia de estas dos áreas, estas mediciones se realizaron empleando el programa ImageJ.

La principal característica de actividad enzimática evaluada en el medio de cultivo enriquecido con sales biliares es la formación de halos de precipitación, éstos debido al

cambio de pH que se presenta en el medio al hidrolizarse las sales biliares y liberar el ácido cólico (McAuliffe, *et al.*, 2005), por otra parte, también es indicativo de actividad enzimática la presencia de halos traslúcidos en el medio, pues se evidencia que el microorganismo ha utilizado los compuestos presentes en el agar para el desarrollo de sus actividades metabólicas.

#### **4.3.2. Evaluación cuantitativa por desconjugación de sales biliares**

Se evaluó la desconjugación de sales biliares cuantificando la concentración de amino ácidos liberados mediante la técnica de ninhidrina. La técnica de ninhidrina es un método colorimétrico que permite la cuantificación de aminoácidos como taurina y glicina, producto de la acción hidrolítica de la enzima, debido a la oxidación y reducción intramolecular de la ninhidrina en presencia de un grupo amino y uno carboxilo libre desarrollando un color violeta en presencia de temperatura de ebullición (Shih-Wen, Yi-Cheng, & Yih-Ming, 2006). Durante este procedimiento, las cepas fueron cultivadas a 37°C durante 24h en caldo MRS, finalizado el periodo de incubación se centrifugaron a 7600 g durante 10 min a 4°C. El pellet celular se lavó dos veces con buffer fosfato (pH 7.0). La concentración celular se ajustó a 1 unidad de Densidad Óptica a 600 nm. Cinco mililitros de la suspensión se sonicaron empleando el baño de ultrasonido Palmer Coler® por 5 min enfriando constantemente con hielo. Se centrifugó a 7600 g a 4°C por 10 min. En 1.8 mL de buffer fosfato (pH 6.0) se adicionó 0.1 mL de sobrenadante y 0.1 mL de la sal biliar: glucolato de sodio 6mM (Sigma G7132-5G), 6mM de taurocolato de sodio (Sigma T4009-5G) o 6mM de taurodeoxicolato de sodio (Sigma T0875-5G) (las concentraciones de 6mM mencionadas son las prevalentes en el intestino delgado (Liong & Shah, 2005)). La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 min. La reacción enzimática se detuvo empleando 2 mL de ácido tricloroacético (15% p/v). La mezcla fue centrifugada a 7600 g a 4°C por 10 min. Se tomaron 20 µL de sobrenadante, 180 µL de agua destilada

y se añadieron a 1,9 mL de reactivo de ninhidrina (Solución A: 0.5 mL de buffer citrato (pH 5.5) con ninhidrina (1% p/v) y 1.2 mL de glicerol, Solución B: Buffer citrato (pH 5.5)). La preparación fue mezclada y se llevó a ebullición por 15 minutos. Terminado el tiempo de ebullición se enfrió inmediatamente en baño de hielo y se leyó en el espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermoscientific) a 570 nm (Liong, *et al.*, 2007). Se empleó glicina o taurina para realizar la curva de calibración. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el equipo Qubit® Fluorometer según indicaciones del fabricante. La actividad de la BSH se definió como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1  $\mu$ mol de glicina/taurina del sustrato por minuto.

#### **4.3.3. Adsorción de colesterol**

Para estudiar la adsorción de colesterol del medio de cultivo, se siguió la metodología propuesta por Kimoto (2002); los microorganismos fueron individualmente cultivados en caldo MRS con 0.2% (p/v) de tioglicolato, suplementado con 0.2% de taurocolato y glucolato de sodio como sales biliares y con adición de una solución de colesterol (Sigma C3045-25G) esterilizada por filtración (10 mg/mL en etanol) para una concentración final de 70  $\mu$ g/ml. El caldo fue inoculado con 1% de cultivo e incubado anaeróticamente con el sistema GasPack (BBL); posterior a la incubación, la mezcla se centrifugó a 7600 g a 4 °C por 15 min. A partir del sobrenadante se midió la concentración de colesterol que permanece en el caldo. Una alícuota se mezcló con KOH (33%, P/V) y 96% de etanol con vortex, se calentó a 60 °C por 15 min y se enfrió a 25 °C. Se añadió hexano, cuya fase se recogió y evaporó bajo nitrógeno gaseoso. Se añadió reactivo o-ftalaldehído (50mg/dL) para disolver el residuo remanente y se añadió ácido sulfúrico a la mezcla; después de 90 min, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 550nm (Lye, Rahmat-Ali, & Liong, 2010).

#### 4.4. Identificación molecular de la presencia de la enzima BSH

La enzima BSH fue identificada en las cepas aisladas con potencial probiótico mediante PCR y se amplificó una región del *gen bsh*, la cual fue secuenciada y analizada filogenéticamente.

##### 4.4.1. Diseño y verificación de primers

Se realizó el diseño de primers utilizando los programas bioinformáticos Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) y GeneRunner, el análisis de las secuencias se realizó con las reportadas en el GenBank (HM036119.1, JQ293998.1, FR874201.1). Los primers obtenidos fueron verificados por BLAST y evaluados por PCR.

##### 4.4.2. Secuenciación y análisis filogenético

Los amplimeros fueron purificados y secuenciados en el equipo Mega Bace DNA Análisis System de Amersham, por Biomol Ltda. Las secuencias fueron analizadas por ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y se realizó el correspondiente análisis.

El análisis filogenético se realizó con diferentes especies del género *Lactobacillus* que han sido evaluadas como probióticas, cuyos genes *bsh* están reportados e informados en el GenBank, Tabla No. 2.

**Tabla 2.** Genes *bsh* presentes en cepas caracterizadas como probióticos

Cepa	Gen	No. acceso GenBank	No. pb	Abreviatura
<i>L. plantarum</i>	<i>bsh 1</i>	FJ439773.1	975	Lp1
	<i>bsh2</i>	FJ439774.1	1017	Lp2
	<i>bsh4</i>	FJ439776.1	954	Lp4
<i>L. johnsonii</i>	<i>Bsh</i>	NC_005362.1	981	Lj
<i>L. acidophilus</i>	<i>bsh a</i>	FJ439780.1	978	Laa
	<i>bsh b</i>	NC_006814.3	978	Lab
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Bsh</i>	JF896461.1	1017	Lrh
<i>L. reuteri</i>	<i>Bsh</i>	FJ006722.1	977	Lr
<i>L. salivarius</i>	<i>bsh 2</i>	FJ591087.1	978	Ls
<i>L. gasseri</i>	<i>Bsh</i>	FJ439777.1	978	Lg
<i>L. fermentum</i>	<i>Bsh</i>	HM036119.1	927	Lf

#### **4.5. Actividad enzimática de la BSH por HPLC**

La actividad de la enzima BSH fue evaluada durante las primeras seis horas de crecimiento bacteriano por la técnica HPLC (Begley *et al.*, 2006; Zago *et al.*, 2011). Las sales biliares fueron extraídas y cuantificadas por HPLC en el Laboratorio de Química de La Universidad de La Sabana, Facultad de Ingeniería.

##### **4.5.1. Extracción de sales biliares**

La extracción de las sales biliares, se realizó tomando 100  $\mu$ L de las cepas activadas en caldo MRS a 37°C por 24 h y se inocularon en caldo MRS suplementado con 1.2 mM de Glucolato de sodio, 2.8 mM Taurocolato de sodio y 2.8 mM Taurodeoxicolato de sodio (Lourenço & Camilo, 2002), se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C, cada dos horas se tomó una muestra para ser analizada por cromatografía. Cada muestra se centrifugó a 7600 g durante 10 min, 1500  $\mu$ L de sobrenadante fueron trasvasados a un tubo, al cual se le adicionó 30  $\mu$ L de HCL 6N (vortex) y 1500  $\mu$ L de metanol grado HPLC (vortex 3 min). Las muestras fueron centrifugadas a 160 g durante 10 minutos a 4°C y luego centrifugadas a 1600 g durante 20 minutos a 4°C, las muestras se llevaron para el análisis en el cromatógrafo HPLC LaChrom Elite Hitachi.

##### **4.5.2. Análisis por HPLC**

Los análisis de HPLC fueron realizados en el equipo LaChrom Elite Hitachi, el cual consta de un sistema cromatográfico con detector de arreglo de diodos (DAD), las muestras fueron evaluadas a una longitud de onda de 200 nm. Para la separación cromatográfica se usó una columna de fase inversa C18 (300 x 3,9 mm) y como fase móvil una mezcla de Buffer acetato pH 4,3 (pH fue ajustado con ácido orto fosfórico Sigma) y metanol (37% y 63% respectivamente) en modo isocrático. A continuación se encuentran las condiciones cromatográficas empleadas:

- ▶ Columna:  $\mu$ Bondapak C18, 15-20  $\mu$ m, 3.9 x 300 mm (Waters)
- ▶ Longitud de onda: 200nm
- ▶ Volumen de inyección: 99,0 $\mu$ L.
- ▶ Flujo: 1,8 mL/min.
- ▶ Temperatura de columna: 25 °C
- ▶ Fase móvil: Buffer acetato 0,05M pH 4,3:Metanol (37:63 v/v)

Para la identificación y cuantificación de las señales se usaron como patrones de referencia soluciones de concentración conocida de taurocolato de sodio (0,167 mg/mL), glucolato de sodio (0,167 mg/mL) y taurodeoxicolato de sodio (0,167 mg/mL). Los estándares fueron disueltos en una mezcla de buffer acetato pH 4,3 y metanol (60:40), de donde se tomó una alícuota de cada uno para finalmente mezclarlos y completar a volumen con el solvente obtenido del tratamiento de un control negativo. Los tiempos de retención para Taurocolato de sodio, Glucolato de sodio y Taurodeoxicolato de sodio fueron: 6.0 min, 8.5 min y 12.4 min.

#### **4.6. Análisis de la expresión de la enzima BSH**

El análisis de la expresión del gen *bsh* se determinó durante las primeras 6h de crecimiento de la cepa *L. fermentum* ATCC 9338 evaluando su comportamiento en condiciones diferentes de aerobiosis/anaerobiosis y presencia o ausencia de sales biliares:

- ▶ S1: Incubación en caldo MRS a 37°C en condiciones aeróbicas.
- ▶ S2: Incubación en caldo MRS enriquecido con 0.5% de taurocolato de sodio a 37°C en condiciones aeróbicas.
- ▶ S3: Incubación en caldo MRS a 37°C en condiciones anaeróbicas.

- S4: Incubación en caldo MRS enriquecido con 0.5% de taurocolato de sodio a 37°C en condiciones anaeróbicas.

#### **4.6.1. Aislamiento del RNA Total**

Se aisló el RNA total empleando el reactivo Trisure (Bioline) con las indicaciones mencionadas por el fabricante. Se centrifugó 1.5mL del cultivo a 7600g a 4°C por 10 min. Luego de descartar el sobrenadante se adicionó 1 mL de Trisure (Bioline) dejando incubar las muestras a temperatura ambiente 5 minutos. Se adicionó 0.2 mL de cloroformo, vortex 15 segundos, y se dejó incubar la reacción durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 7600 g, durante 15 minutos a 4°C. Finalizado el tiempo de centrifugación se presentó una división trifásica: fase fenol-cloroformo, inter fase y una fase acuosa que contiene el RNA, se transfirió la última fase a un tubo limpio libre de RNAasas. Al producto transferido se le adicionó 0.5 mL de isopropanol a 4°C, se mezcló por inversión suavemente y se centrifugó a 7600 g, durante 10 minutos a 4°C (se descartó el sobrenadante). Se adicionó 1 mL de etanol 75% (4°C), vortex 1 segundo y se centrifugó a 7600 g, durante 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el etanol y se adicionó 0.05 mL de agua libre de DNAsas. El RNA total obtenido se cuantificó en el Qubit® Fluorometer (Invitrogen).

#### **4.6.2. Síntesis de cDNA**

Una vez cuantificado el RNA total se procedió a realizar la conversión empleando el Kit de síntesis de cDNA con MMLV Reverse transcriptase 1<sup>st</sup>-standard cDNA (Epicentre) siguiendo las indicaciones descritas por los fabricantes y ajustando la concentración de RNA a convertir en 10 ng/mL para todas las muestras.

Inicialmente se realizó una mezcla a 4°C de 1µL de random primers (50µM), X µL RNA y XµL de Agua libre de RNAsas (según muestra) hasta completar un volumen final de

12.5µL. Se incubó la reacción a 65°C por 2 minutos inmediatamente finalizado el tiempo se enfrió en hielo durante 1 minuto. Luego se añadieron en baño frío los siguientes reactivos: 2 µL MMLV-RT 10X Reaction Buffer, 2 µL DTT 100 mM, 2 µL dNTP Premix, 0.5 µL Ribo Guard RNasa inhibitor, 1 µL MMLV Reverse transcriptasa. Se mezcló la reacción por pipeteo e incubó a 37°C durante 60 minutos, luego se incubó a 85°C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente a 4°C durante 1 minuto. Los productos obtenidos se almacenaron a -20°C.

#### **4.6.3. Amplificación de los productos de cDNA**

El gen 16S rRNA fue empleado como referencia de la expresión del gen *bsh* (Kumar *et al.*, 2012). Los primers utilizados para el 16S rRNA fueron descritos por Woo *et al.*, en el 2002 y el gen *bsh* se amplificó como se estandarizó anteriormente en el Numeral 4.4. Los amplímeros se verificaron en gel de agarosa al 1.5%, las bandas de ADN fueron visualizadas en el equipo Quantityone (BioRad), por medio del software Quantityone 4.6.8 (BioRad) se calculó la intensidad de las bandas y se halló la relación entre el gen de referencia y el gen de interés.

#### **4.7. Análisis estadístico**

Los ensayos fueron realizados por triplicado. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA de un factor ( $\alpha=0.05$ ) y comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15.0 y JMP versión 8.0.2.

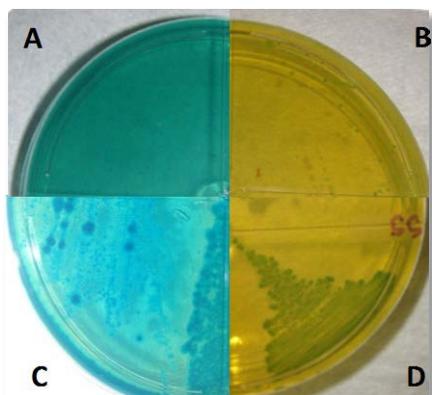
## 5. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el potencial hipocolesterolémico de bacterias ácido lácticas aisladas de matrices lácteas y caracterizadas como potenciales probióticos. Se hizo un estudio molecular del gen *bsh* con especies del género *Lactobacillus*, y su relación con la actividad enzimática.

### 5.1. Aislamiento de cepas del género *Lactobacillus*

Se aislaron 53 cepas entre muestras de suero costeño, queso Paipa y leche cruda, de las cuales, 23 aislamientos correspondieron a bacilos Gram positivos, catalasa negativa. Los aislamientos fueron codificados según el origen de la muestra (primera letra), el número de la muestra (primer número), número de aislamiento (segundo número) y tipo de colonia (última letra) (L =Leche cruda y S= Suero Costeño) (Tabla No.3).

Las 23 cepas aisladas fueron sembradas en el medio MRS selectivo empleado en la industria láctea para diferenciar las colonias de *L. acidophilus* de la flora acompañante del producto (Darukaradhya, *et al.*, 2006; Dave & Shah, 1996), en este medio la fermentación de sorbitol (vira el color azul a amarillo por el indicador verde de bromocresol) y resistencia a la clindamicina permite la identificación de dicha especie (Figura No.2).



**Figura 2.** Medio selectivo para la cepa *L. acidophilus*. **Figura 2-A.** Medio sin siembra, **Figura 2-B.** Cepa *L. acidophilus* ATCC 4356, **Figura 2-C.** Aislamiento L2-3 proveniente de leche cruda, **Figura 2-D.** Aislamiento S-5 proveniente de suero costeño.

Se identificaron 16 cepas que fermentaron el sorbitol y generaron acidificación del medio (Figura No.2-B y Figura No.2-D); tres cepas no mostraron esta característica pero sí son resistentes al antibiótico (Figura No.2-C) y cuatro cepas no mostraron crecimiento. Éstos resultados permiten sugerir que éstas cepas son presuntivas de *L. acidophilus*, por ésta razón los 16 aislamientos fueron sometidos a la caracterización probiótica.

## 5.2. Caracterización de microorganismos con potencial probiótico *in vitro*

De acuerdo a los lineamientos de la FAO (2002) la caracterización de un microorganismo probiótico se realiza por la evaluación de la tolerancia a pH ácido, concentración de sales biliares, resistencia a antibióticos e identificación molecular hasta especie.

La evaluación de tolerancia a pH ácido y concentración de sales biliares mostró que 12 cepas sobrevivieron a un pH 2.0 durante 2 horas y toleraron 0.3% de sales biliares durante el mismo periodo de tiempo, el resto de las cepas estudiadas no toleraron alguna las dos condiciones. El recuento inicial en ambas condiciones de crecimiento no mostró variaciones estadísticamente significativas (Tabla No. 3), sin embargo, después de las

dos horas de incubación se encontró que sí existe diferencia significativa al comparar el recuento inicial  $9.12 \times 10^{11}$  UFC/mL con el recuento final para pH 2.0,  $9 \times 10^6$  UFC/mL y para sales biliares  $7.5 \times 10^6$  UFC/mL en todas las cepas evaluadas. El porcentaje promedio de supervivencia de las cepas en el medio ajustado a pH 2.0 fue de 83.4% y 73.6% el obtenido en el medio enriquecido con 0.3% de sales biliares, Tabla No. 3. De las cepas seleccionadas como microorganismos potencialmente probióticos, la cepa L1-4 presentó la mayor tolerancia ante las condiciones de pH 2.0 y sales biliares 0.3%, disminuyendo en promedio  $2.05 \pm 1.08$  unidades logarítmicas y la cepa que presentó menor tolerancia fue L2-2 disminuyendo en promedio  $4.4 \pm 0.79$  unidades logarítmicas. Lo cual permite sugerir que los microorganismos toleran las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal durante las dos horas que dura el trayecto.

**Tabla 3.** Simulación de la tolerancia a jugo gástrico y sales biliares por aislamiento

Nombre Muestra	Tipo Muestra	Origen muestra	Nº Aislamientos	Aislamientos con potencial probiótico	Recuento inicial Log UFC/mL	Tolerancia pH 2.0		Tolerancia Sales Biliares 0.3%	
						Rto 2 h	% sobrevivencia	Rto 2h	% sobrevivencia
L1	Leche cruda	Cota, Cundinamarca	2	L1-1	9.18 $\pm 0.21$	7.2 $\pm 0.1$	89.06 $\pm 0.21$	4.08 $\pm 21$	63.41 $\pm 0.13$
				L1-4	9.24 $\pm 0.19$	8.48 $\pm 18$	96.15 $\pm 0.2$	5.88 $\pm 06$	79.65 $\pm 0.15$
L2	Leche cruda	Bogotá, DC	2	L2-2	9.14 $\pm 0.27$	5.3 $\pm 0.38$	75.39 $\pm 0.24$	4.18 $\pm 0.21$	64.61 $\pm 0.18$
				L2-3	9.19 $\pm 0.28$	6.49 $\pm 0.26$	83.79 $\pm 0.18$	6.04 $\pm 0.14$	80.57 $\pm 0.2$
S1	Suero Costeño	Cartagena, Bolívar	7	S1-1ª	9.07 $\pm 0.38$	NC*	0	4.5 $\pm 09$	53.28 $\pm 0.12$
				S1-1b	8.91 $\pm 0.26$	7 $\pm 0.30$	91.76 $\pm 0.33$	5.40 $\pm 0.6$	78.95 $\pm 0.35$
				S1-2ª	8.79 $\pm 0.22$	NC	0	NC	0
				S1-2b	9.61 $\pm 0.19$	NC	0	NC	0
				S1-3ª	9.51 $\pm 0.36$	NC	0	4.40 $\pm 0.19$	71.23 $\pm 0.15$
				S1-3b	9.48 $\pm 0.25$	NC	0	4.54 $\pm 0.2$	67.31 $\pm 0.17$
				S1-4b	8.88 $\pm 0.21$	5.48 $\pm 0.36$	77.89 $\pm 0.26$	5.11 $\pm 19$	74.74 $\pm 0.21$
S3	Suero Costeño	Cartagena, Bolívar	3	S3-1ª	9.26 $\pm 0.27$	7 $\pm 0.25$	76.88 $\pm 0.16$	5.54 $\pm 2$	88.02 $\pm 13$

				S3-1b	9 ±38	3.5 ±0.25	59.74 ±0.14	NC	0
				S3-1c	9.02 ±0.21	NC	0	NC	0
S4	Suero costeño	Cartagena, Bolívar	9	S4-1ª	8.91 ±0.3	6.18 ±0.4	83.24 ±0.21	NC	0
				S4-1b	8.91 ±0.19	6.81 ±0.23	87.73 ±0.17	5.90 ±0.2	81.18 ±0.16
				S4-1d	9.43 ±0.26	6.6 ±0.29	84.11 ±0.21	3.48 ±0.14	55.54 ±0.2
				S4-2ª	9.06 ±0.21	6.7 ±0.21	86.3 ±0.18	5.00 ±0.12	73.03 ±0.16
				S4-2b	9.3 ±0.31	5.54 ±0.18	76.8 ±0.13	4.30 ±0.21	65.42 ±0.25
				S4-3b	9.74 ±0.34	NC	0	NC	0
				S4-3d	9.23 ±0.29	6.4 ±0.41	83.51 ±0.22	NC	0
				S4-4 b	9.43 ±0.1	NC	0	4.02 ±0.12	64.01 ±0.15
				S4-4d	9.06 ±0.32	NC	0	NC	0
S7	Suero costeño	Cartagena, Bolívar	1	S7-2b	9.02 ±0.24	5.32 ±0.19	76.01 ±0.21	5.70 ±0.21	79.12 ±0.26

\*NC: No hubo crecimiento. Los valores representan el promedio más o menos desviación estándar ( $\pm$  DE); n = 3, no hay diferencias estadísticamente significativas entre réplicas para  $\alpha=0.05$ . Recuento inicial (Log UFC/mL) no mostraron diferencias estadísticamente significativas para  $\alpha=0.05$ . Las cepas sombreadas fueron seleccionadas para estudios posteriores.

El segundo criterio de selección de un microorganismo con potencial probiótico, siguiendo los lineamientos de la FAO (2002) y de EFSA (2008) (Bresson *et al.*, 2008; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002), elegido para este estudio fue presentar sensibilidad ante antibióticos, donde se observó que solo 1 cepa de las 12 cepas pre-seleccionadas mostró ésta característica, Tabla No. 4.

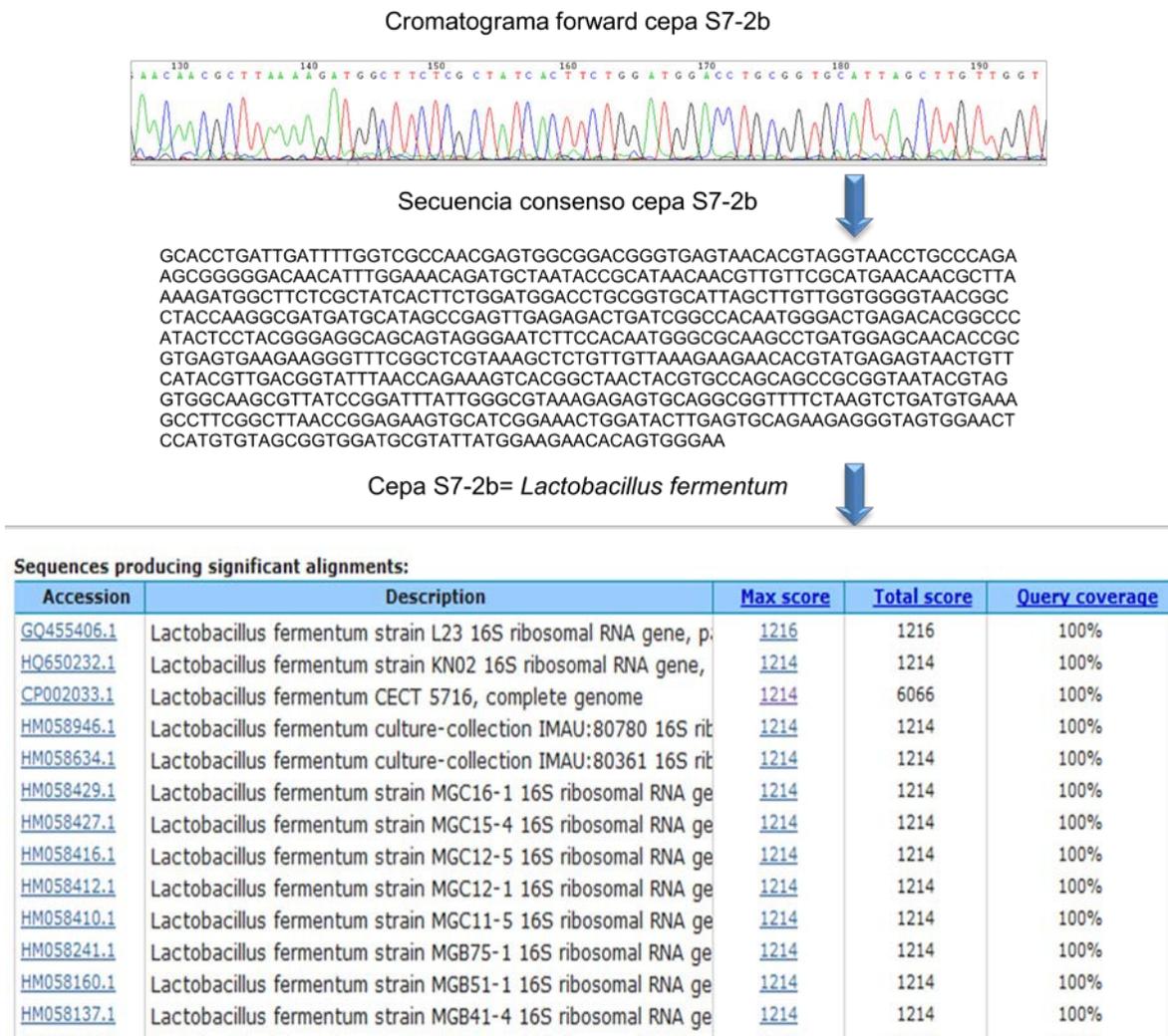
**Tabla 4.** Antibiograma realizado a las cepas pre-seleccionadas como potenciales probióticos

Cepa	L1-1	L1-4	L2-2	L2-3	S1-1b	S1-4b	S3-1a	S4-1b	S4-1d	S4-2a	S4-2b	S7-2b
Penicilina G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Tetraciclina	S	R	R	I	S	R	R	S	R	R	R	S
Rifampicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S
Norfloxacina	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S
Eritromicina	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S
Clindamicina	R	S	R	I	I	R	S	R	S	R	R	S
Cloramfenicol	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S
Amoxicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
Gentamicina	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
Metronidazol	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
Ac. Nalidixico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S
Vancomicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Cefoxitin	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S

R: Resistente; I: Intermedia; S: Sensible. La cepa sombreada, S7-2b, fue sensible a todos los antibióticos evaluados.

El aislamiento No S7-2b cumplió con la caracterización probiótica propuesta en este estudio, razón por la cual se identificó molecularmente mediante la secuenciación del segmento V1-V2 del gen 16S rRNA.

La identificación molecular para la cepa S7-2b se hizo por bioinformática en donde se obtuvo una secuencia consenso de 660pb de la región 16S rRNA, la cual presentó homología del 100% frente a *Lactobacillus fermentum* (número de acceso al GenBank AF302116.1), Figura No. 3.



**Figura 3.** Análisis bioinformático para la identificación molecular de la cepa S7-2b

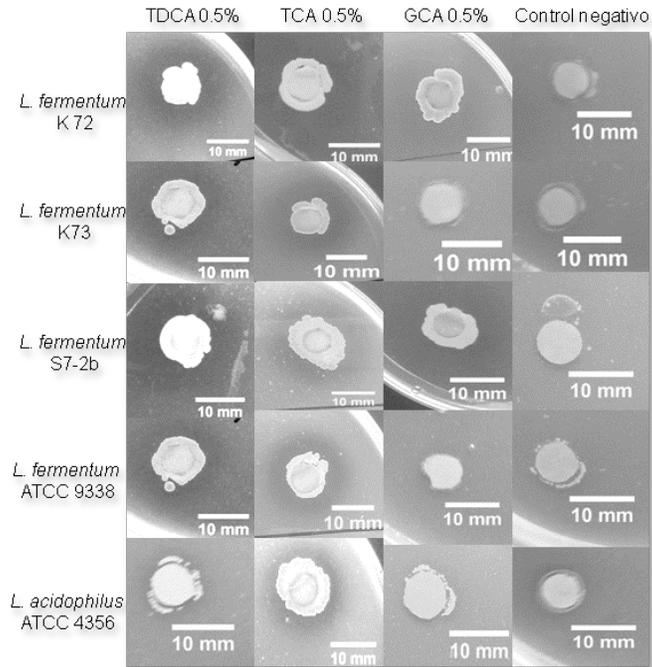
Ésta cepa cumplió satisfactoriamente los criterios de inclusión como microorganismo probiótico. Para continuar con el estudio se tomaron adicionalmente cinco cepas *L. fermentum* caracterizadas como potenciales probióticos en estudios anteriores (Acuña, 2009).

### **5.3. Evaluación Bioquímica del potencial hipocolesterolémico**

La evaluación bioquímica del potencial hipocolesterolémico se realizó para las cepas *L. fermentum* (1-1, K11, K72, K73, K75) y la cepa *L. fermentum* S7-2b. Como controles positivos se utilizaron *L. acidophilus* ATCC 4356 y *L. fermentum* ATCC 9338. Todas las cepas fueron evaluadas cualitativa y cuantitativamente para la actividad enzimática BSH y la adsorción de colesterol.

#### **5.3.1. Evaluación cualitativa de la presencia de la enzima BSH**

La presencia de la enzima se observó por el crecimiento en el medio MRS enriquecido con sales biliares. Las ocho cepas presentaron crecimiento en el medio modificado, pero solo las cepas *L. fermentum* K72, K73, S7-2b, *L. fermentum* ATCC 9338 y *L. acidophilus* ATCC 4356, mostraron actividad de enzimática BSH, Figura No. 4.



**Figura 4.** Halos indicativos de actividad enzimática. Los halos translucidos de actividad enzimática se muestran para cada una de las cepas. El control negativo corresponde al medio sin enriquecimiento con sales biliares.

Las cepas presentaron diferentes características de crecimiento macroscópicas (Figura No. 4), siendo los crecimientos de las colonias irregulares en comparación con el control, razón por la cual, no se tomaron los diámetros de los halos como lo realizan otros autores (Guo, *et al.*, 2010; Jamaly, Benjouad, & Bouksaim, 2011; Kaushik, *et al.*, 2009; R. Kumar, *et al.*, 2010; Sridevi, *et al.*, 2009), sino que se midió el área del halo correspondiente a la actividad enzimática y se le restó el área del crecimiento bacteriano para normalizar los resultados, de esta forma se pueden realizar comparaciones más objetivas entre las cepas, Tabla No. 5.

**Tabla 5.** Diferencia entre el área del halo de actividad enzimática y el área de crecimiento de la colonia

	<i>L. fermentum</i> K72 (mm <sup>2</sup> )	<i>L. fermentum</i> K73 (mm <sup>2</sup> )	<i>L. fermentum</i> S72b (mm <sup>2</sup> )	<i>L. fermentum</i> ATCC 9338(mm <sup>2</sup> )	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356(mm <sup>2</sup> )
Taurodeoxicolato de sodio 0.5%	304.52±5.99 <sup>s</sup>	133.15± 2.12 <sup>s</sup>	435.29± 5.37 <sup>s</sup>	176± 1.31 <sup>s</sup>	46.76 ± 5.72 <sup>s</sup>
Taurocolato de Sodio 0.5 %	266.05 ± 3.61 <sup>s</sup>	255. 10 ± 4.59 <sup>s</sup>	312.93± 5.23 <sup>NS</sup>	278.44 ± 3.38 <sup>s</sup>	98.71 ± 3.44 <sup>s</sup>
Glucolato de sodio 0.5%	321.72 ± 5.20 <sup>s</sup>	4.37 ± 1.43 <sup>s</sup>	314.19 ± 5.53 <sup>NS</sup>	6.06 ± 3.56 <sup>s</sup>	4.25 ± 1.42 <sup>s</sup>

Los valores representan el promedio más o menos desviación estándar ( $\pm$  DE); n = 3, no hay diferencias estadísticamente significativas entre réplicas para  $\alpha=0.05$ . Prueba de comparación de medias de Tukey con intervalo de confianza del 95%. P < 0,05; NS: no significativos. S: significativos. Comparaciones realizadas respecto a la actividad enzimática de cada cepa frente a cada sustrato.

La evaluación cualitativa normalizada de la actividad enzimática BSH mostró que las cepas *L. fermentum* K72, K73 y S7-2b mostraron actividad frente a los tres sustratos, luego de 72 horas de incubación, éstos resultados son consistentes con los hallazgos moleculares en donde éstas cepas evidenciaron la presencia del gen *bsh*. Se empleó la prueba de comparación de medias de Tukey para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre la actividad enzimática de cada cepa hacia las diferentes sales biliares (TCA, GCA y TDCA). Las cepas *L. fermentum* K73, *L. fermentum* ATCC 9338 y *L. acidophilus* ATCC 4356, presentaron mayor actividad frente a TCA 0.5%, y menor actividad en el medio enriquecido con GCA 0.5%; por el contrario, la cepa *L. fermentum* K72 mostró más actividad en presencia de GCA 0.5% y menor actividad hacia TCA 0.5% como sustrato.

La cepa *L. fermentum* S7-2b, no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre la actividad enzimática evaluada hacia TCA y GCA 0.5%, pero sí hacia TDCA 0.5% en donde se evidenció la mayor actividad hidrolítica. Todas las cepas presentaron actividad frente TDCA y TCA, y las cepas *L. fermentum* K73, *L. fermentum*

ATCC 9338 y *L. acidophilus* ATCC 4356, no mostraron actividad significativa en presencia de GCA.

### **5.3.2. Evaluación cuantitativa por desconjugación de sales biliares**

Se evaluó la actividad enzimática cuantitativa desde un punto de vista funcional sometiendo el extracto enzimático de las cepas evaluadas a sales biliares en las concentraciones presentes en el intestino delgado mediante la técnica de ninhidrina.

Para la cuantificación se realizaron curvas de calibración de glicina ( $y=6.170x-0.034$ ;  $R^2=0.995$ ) y taurina ( $y=0.458x-0.014$ ;  $R^2=0.999$ ) desde 1 a 8 mmol/mL (Anexo No. 10.1), las cuales fueron validadas estadísticamente en donde se demostró para un nivel de confianza del 95% que el intercepto es estadísticamente igual a cero, la pendiente es significativamente diferente de cero y que existe correlación entre Y-X (Anexo No. 10.2). La actividad de la enzima BSH a partir de los extractos celulares se muestra en la Tabla No. 6, la concentración de sustratos (TCA, GCA y TDCA) fue de 6mM, la cual corresponde a la concentración fisiológica en un individuo sano (Oh, *et al.*, 2008).

De forma paralela se realizaron curvas de crecimiento para determinar el momento en el cual los microorganismos se encontraban en fase estacionaria, en promedio para todas cepas, esta fase inicia a la 10 horas de crecimiento, momento en el cual se realizó la extracción enzimática (Anexo No. 10.3).

**Tabla 6.** Actividad de la enzima BSH

Cepa	Proteína mg/mL*	Glucolato de sodio		Taurocolato de sodio		Taurodeoxicolato de sodio	
		Actividad total (U mL <sup>-1</sup> )	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> )	Actividad total (U mL <sup>-1</sup> )	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> )	Actividad total (U mL <sup>-1</sup> )	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> )
<i>L. fermentum</i> 1-1, K11 y K75	0.74±0.04	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>L. fermentum</i> K72	0.69±0.1	N/A	N/A	1.034±0.12	1.5±0.10	1.09±0.26	1.58±0.18
<i>L. fermentum</i> K73	0.72±0.09	2.02±0.06	2.92±0.10	1.73±0.22	2.4±0.10	1.21±0.13	1.67±0.16
<i>L. fermentum</i> S7-2b	0.7±0.14	1.57±0.13	2.23±0.12	1.5±0.06	2.14±0.08	1.26±0.07	1.8±0.06
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	0.75±0.08	N/A	N/A	1.27±0.25	1.69±0.15	0.89±0.13	1.18±0.01
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	0.71±0.11	0.49±0.13	0.068±0.3	1.08±0.13	1.52±0.1	0.58±0.13	0.81±0.1

La tabla muestra la actividad enzimática BSH (U) expresada como la cantidad de enzima requerida para la liberación de 1 μmol de glicina/taurina del sustrato por minuto. N/A. No mostró actividad enzimática. Los valores representan el promedio más o menos desviación estándar (± DE) n = 3, no hay diferencias estadísticamente significativas entre réplicas para α=0.05.\*No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de proteínas extraídas para un α=0.05.

Las cepas *L. fermentum* K72, K73 y S7-2b evidenciaron actividad enzimática, resultado congruente con la evaluación cualitativa de la presencia de la enzima BSH. Se observó que el aislamiento *L. fermentum* K73 tuvo mayor actividad tanto específica como total frente a los tres sustratos. No se observó actividad de *L. fermentum* K72 y *L. fermentum* ATCC 9338 frente a glucolato de sodio. Se observó que las tres cepas presentaron más actividad frente a las sales conjugadas con taurina.

La evaluación cualitativa y cuantitativa mostró que la cepa *L. fermentum* S7-2b presentó mayor actividad en la evaluación cuantitativa (medida a la hora 10 de crecimiento bacteriano) hacia las sales conjugadas con taurina, especialmente por TCA, pero en la evaluación cualitativa (medida a la hora 72 de crecimiento bacteriano) mostró mayor actividad frente a TDCA y en segundo lugar a GCA. De forma similar, la cepa *L.*

*fermentum* K73 en la evaluación cuantitativa mostró mayor actividad hacia GCA y menor actividad enzimática por el sustrato TDCA, sin embargo, en la evaluación cualitativa la mayor actividad enzimática fue TCA y no mostró actividad hacia GCA. Finalmente, la cepa *L. fermentum* K72 no mostró actividad enzimática hacia GCA en la evaluación cuantitativa, pero en la evaluación cualitativa éste fue el sustrato hacia el cual mostró mayor actividad. Estos comportamientos de actividad enzimática muestran que las cepas posiblemente utilizan la enzima BSH como un instrumento para la obtención de nutrientes, debido a que a la hora 72 se presenta mayor actividad enzimática por el sustrato que a la hora 24 presentaba menor actividad.

### **5.3.3. Adsorción de colesterol**

La adsorción de colesterol se desarrolló según la metodología descrita por Kimoto y colaboradores (2003). La curva de calibración se realizó desde 10 a 70 µg/mL, ( $y = 0.014x + 0.009$ , con  $R^2 = 0.995$ ) (Anexo No. 10.4), fue validada estadísticamente en donde se demostró para un nivel de confianza del 95% que el intercepto es estadísticamente igual a cero, la pendiente es significativamente diferente de cero y que existe correlación entre Y-X (Anexo No. 10.5).

Las cepas seleccionadas como potenciales probióticos mostraron la capacidad de adsorber el colesterol en diferentes proporciones, siendo concordante con el análisis estadístico que mostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras con un  $\alpha=0.05$ . La cepa que adsorbió el mayor porcentaje de colesterol presente en el medio de cultivo (70µg/mL) fue *L. fermentum* K73 adsorbiendo  $53.06 \pm 2.53$  µg/mL del medio de cultivo y la de menor capacidad de adsorción fue *L. fermentum* ATCC 9338 adsorbiendo  $2.02 \pm 0.95$  µg/mL, Tabla No. 7.

**Tabla 7.** Porcentaje de adsorción del colesterol

Cepa	Colesterol adsorbido <sup>-1</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Porcentaje de colesterol adsorbido (%)
<i>L. fermentum</i> K72	18.69 $\pm$ 1.70	26.7
<i>L. fermentum</i> K73	53.06 $\pm$ 2.69	75.8
<i>L. fermentum</i> S7-2b	43.69 $\pm$ 1.70	62.4
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	2.02 $\pm$ 0.95	4.87
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	47.85 $\pm$ 1.7	68.36

Los valores representan el promedio más o menos desviación estándar ( $\pm$  DE); n = 3, no hay diferencias estadísticamente significativas entre réplicas para  $\alpha=0.05$ .

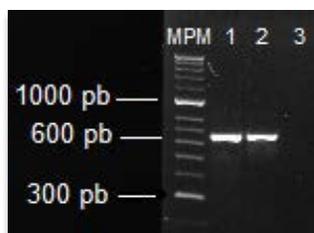
#### 5.4. Identificación molecular de la presencia de la enzima BSH

Para la identificación molecular de la presencia de la enzima BSH de los microorganismos evaluados se realizó bajo el criterio que el *gen bsh* varía según la especie (Yin, *et al.*, 2011). Razón por la cual, los primers diseñados son específicos para cepas de *L. fermentum*, Tabla No. 8.

**Tabla 8.** Primers específicos para el *gen bsh* de *L. fermentum*

Nombre	Secuencia	N° pares de bases (pb)	Tm
LfHSB-f	5'- CCCAAGCCGCCTACCCCTCT-3'	20	60°C
LfHSB-r	5'- CGGCAGGTGCGCCATCTTCA- 3'	20	60°C

Los primers fueron utilizados para la estandarización de la PCR. Las condiciones determinadas fueron: Buffer 1x (Bioline), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Bioline), mix dNTPs 0.4mM (Bioline), Primer Forward 0.2mM, Primer Reverse 0.2mM, Taq 1.25U (Bioline), ADN 5ng/ $\mu$ L. Las condiciones de termociclado fueron: 95°C durante 3 min; 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 45 seg a 60°C, 30 seg a 72°C; y una extensión final de 72°C durante 3 min; obteniéndose el fragmento esperado de 638 pb, Figura No. 5.



**Figura 5.** Estandarización PCR *gen bsh*. MPM: Marcador de peso molecular, Carril 1. Cepa K72, Carril 2. *L. fermentum* ATCC 9338, Carril 3. Control Negativo

Posterior a la estandarización de la técnica, se evaluó la presencia del *gen bsh* en las cepas con potencial probiótico, se observó que las cepas de *L. fermentum* K72, K73 y S7-2b poseían el gen (Figura No. 6) lo cual concuerda con la evaluación cualitativa y cuantitativa de la presencia de la enzima.



**Figura 6.** Identificación molecular del *gen bsh* en las cepas con potencial probiótico. MPM: Marcador de peso molecular; Carril 1: Cepa *L. fermentum* 1-1; Carril 2: Cepa *L. fermentum* K11; Carril 3: Cepa *L. fermentum* K72; Carril 4: Cepa *L. fermentum* K73; Carril 5: Cepa *L. fermentum* K75; Carril 6: Cepa *L. fermentum* S7-2b; CN: Control negativo; CP: Control positivo *L. fermentum* ATCC 9338.

Los amplímeros de las cepas *L. fermentum* K72, K73, S7-2b y *L. fermentum* ATCC 9338 obtenidos fueron secuenciados y analizados bioinformáticamente, obteniéndose las secuencias consenso (Anexo No. 10.6). El alineamiento múltiple (ClustalW) para determinar la relación filogenética entre las secuencias obtenidas y su relación con las secuencias del *gen bsh* de otras cepas reportadas como probióticas se realizó inter e intra especies entre las secuencias reportadas en el GenBank.

El filograma inter especies mostró que las secuencias se agrupan en tres grupos (Figura No. 7). La secuencia de *L. fermentum* K72 y *L. fermentum* S7-2b, provienen de un mismo origen, pues se derivan del mismo nodo, muestran un 98% de similitud entre sus secuencias, sin embargo, fenotípicamente son distintas pues la longitud de las ramas es diferente. La cepa *L. fermentum* K73 muestra un origen distinto y la mayor diferencia fenotípica y genotípica entre las cepas analizadas, lo cual se evidencia en la longitud de la rama filogenética y en el 97% de similitud frente a todas las cepas estudiadas. Finalmente, la cepa *L. fermentum* ATCC 9338 y la cepa *L. fermentum* K72 presentan alta similitud por poseer la misma distancia desde la raíz del árbol, lo cual se evidencia en el 99% de similitud entre sus pares de bases.

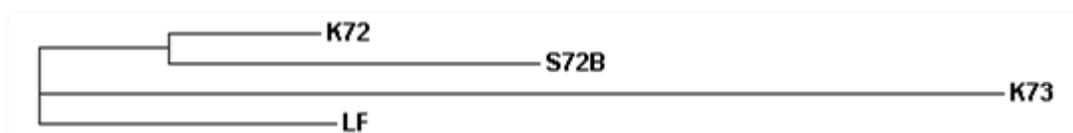
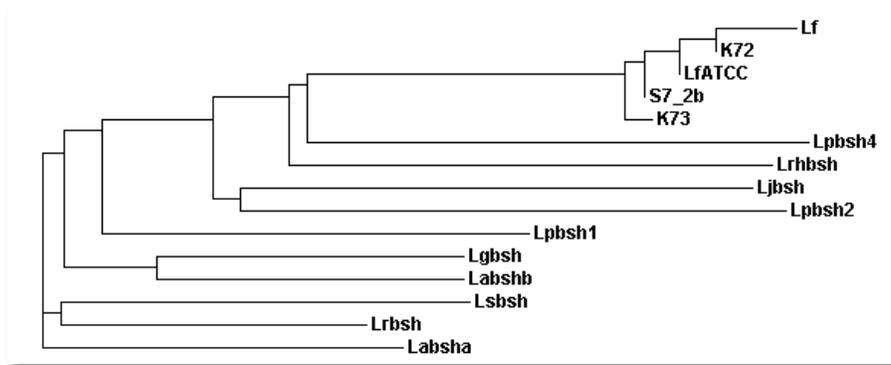


Figura 7. Filograma cepas *L. fermentum*

La variabilidad genotípica del *gen bsh* intra especies se evidencia en los porcentajes de homología que se muestran en el Anexo No. 10.7. La relación intra-especies muestra que el *gen bsh* secuenciado de las cepas *L. fermentum* presenta muy baja homología frente a los genes *bsh* de las demás especies, en promedio 50%, siendo el *gen bsh* 4 de *L. plantarum* con el que se presenta una mayor homología 54% (Figura No. 8). Al realizar el estudio del filograma, se observa que las secuencias analizadas provienen de un mismo nodo conformando un grupo aparte en comparación con las secuencias de las otras especies, a pesar de presentar regiones homólogas entre ellas.



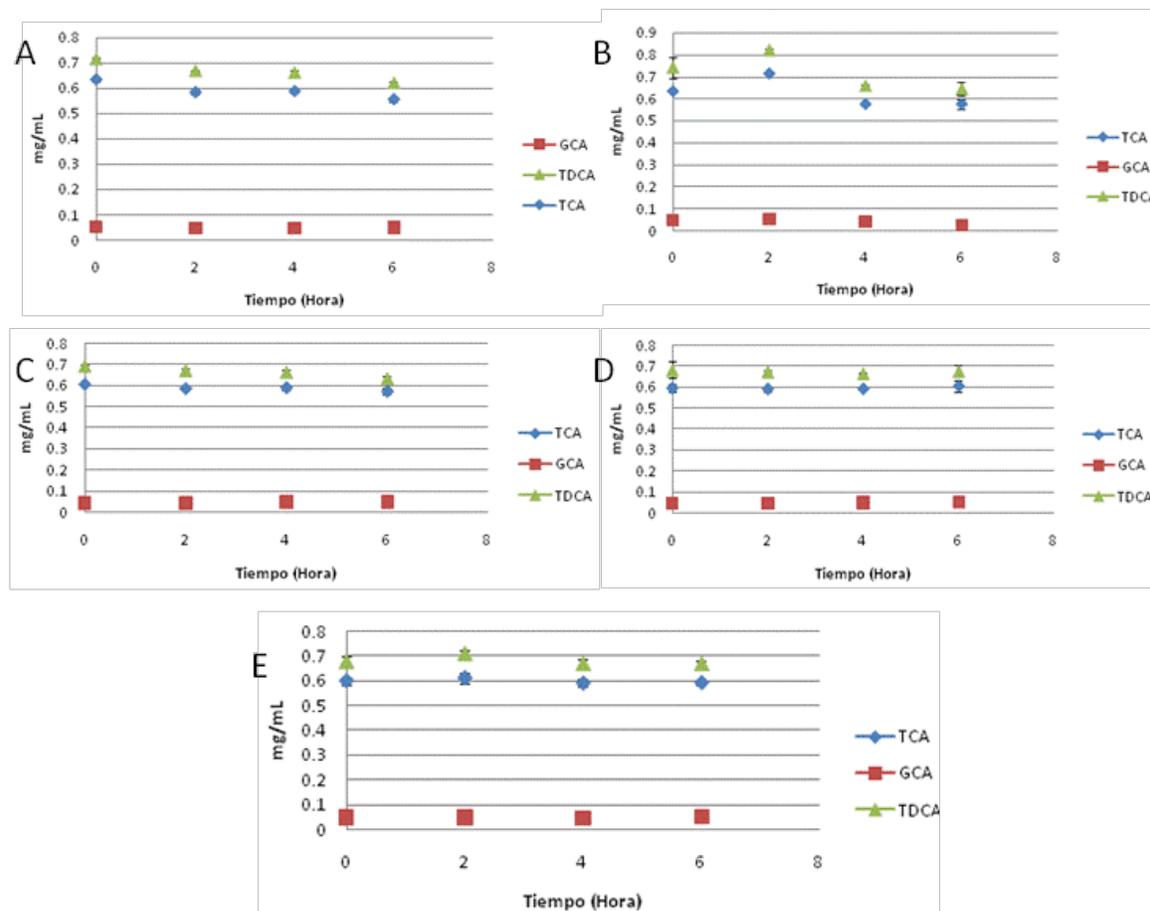
**Figura 8.** Filograma *gen bsh* en distintas especies del género *Lactobacillus*

El filograma y la tabla de porcentaje de identidad muestran que el *gen bsh* 4 de *L. plantarum* y el *gen bsh* de *L. rhamnosus*, presentan alta homología (Jiang, *et al.*, 2010), 62,85%, con los genes provenientes de las cepas *L. fermentum* lo cual se refleja en la cercanía en sus nodos. El *gen bsh* de las cepas *L. salivarius* y *L. reuteri* mostraron un porcentaje de identidad de 68% y presentan un origen común en el filograma, de la misma forma, las cepas que presentan porcentajes de identidad superiores al 60% muestran un origen filogenético cercano o provienen del mismo nodo. Por otro lado, se observa que los genes provenientes de la misma especie como *L. acidophilus* y *L. plantarum*, tampoco presentan altos porcentajes de homología, cercanos al 52% en promedio.

### 5.5. Actividad enzimática de la BSH por HPLC

La actividad enzimática de la BSH se evaluó al determinar la hidrolisis de las sales biliares presentes en el medio durante la fase exponencial de crecimiento microbiano para identificar cuando da inicio la actividad y correlacionarlo con el momento en el cual se expresa la enzima; debido a que la concentración celular es baja en las primeras seis horas de crecimiento y la enzima de carácter intracelular, se empleó la metodología HPLC (Martoni *et al.*, 2007). Se monitoreó la actividad enzimática a la hora cero, dos, cuatro y

seis, de crecimiento, y se empleó el estadístico de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) (Anexo No. 10.8) para determinar la hora en la cual hubo cambios en dicha actividad.



**Figura 9.** Desconjugación de sales biliares durante la fase exponencial medida por HPLC. **Figura 9-A.** Desconjugación de sales biliares para *L. fermentum* K72. **Figura 9-B.** Desconjugación de sales biliares para *L. fermentum* K73. **Figura 9-C.** Desconjugación de sales biliares para *L. fermentum* S7-2b. **Figura 9-D.** Desconjugación de sales biliares para *L. fermentum* ATCC 9338. **Figura 9-E.** Desconjugación de sales biliares para *L. acidophilus* ATCC 4356.  $n = 3$ , no hay diferencias estadísticamente significativas entre réplicas para  $\alpha=0.05$ .

Todas las cepas mostraron actividad hacia sales conjugadas con taurina, reportándose incremento de la actividad a la hora seis, sin embargo la cepa *L. fermentum* K73, fue la única que mostró actividad frente a GCA. El aislamiento *L. fermentum* K72, mostró actividad enzimática a la hora dos, la cual se mantuvo durante la hora cuatro y se evidenció una disminución de sustrato en el medio de cultivo a la hora seis para TCA y

TDCA; no hubo actividad durante este periodo de tiempo frente a GCA. *L. fermentum* S7-2b no mostró diferencias estadísticamente significativas entre medias a un  $\alpha=0.05$  para GCA y TCA, sin embargo se observó una disminución de TDCA entre la hora cuatro y la hora seis (Figura No. 9).

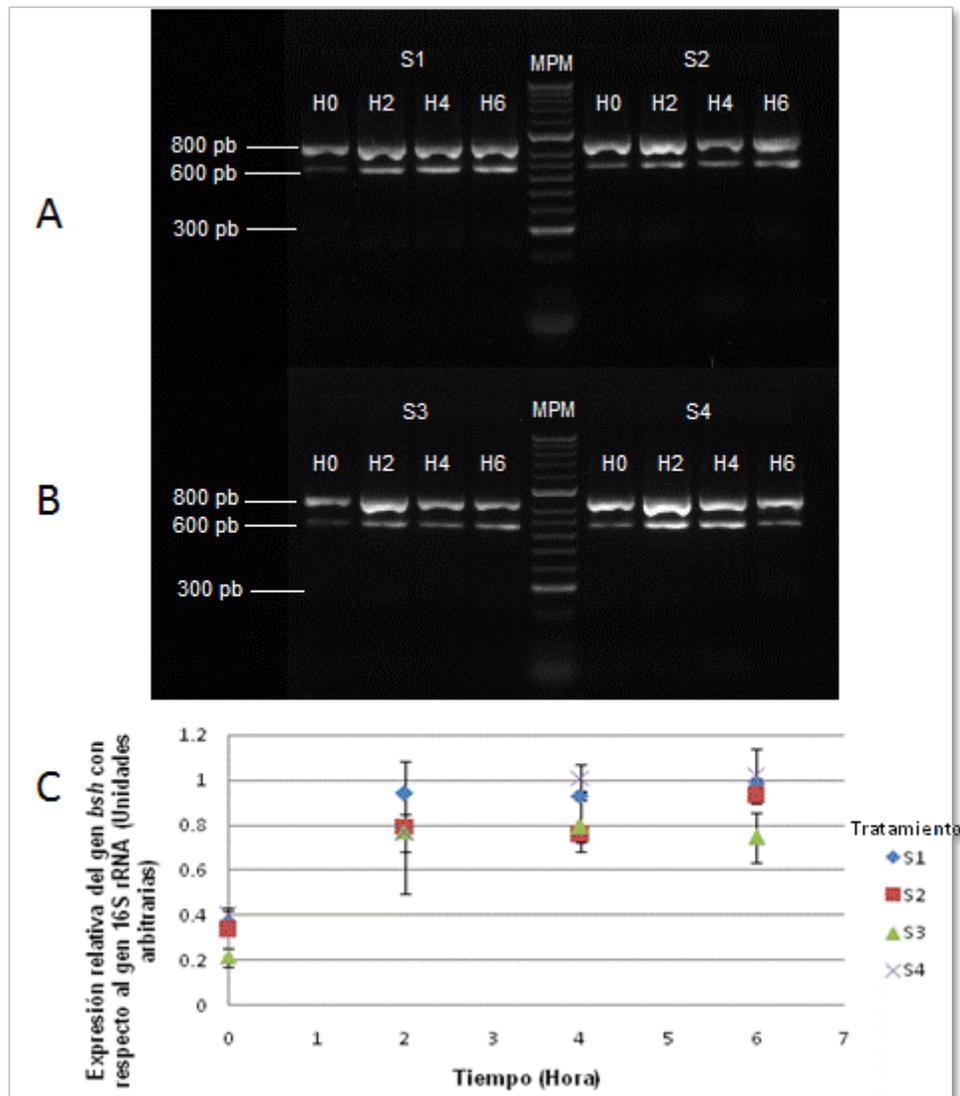
La cepa *L. fermentum* K73 inició actividad enzimática a la hora dos, la cual se mantuvo hasta la hora cuatro, en donde se observó una disminución de TCA constante hasta la hora seis. La cinética presentada para GCA, fue una disminución periódica durante las cuatros horas evaluadas y se observó que a la hora dos hubo inicio de actividad enzimática, manteniéndose constante entre la hora cuatro y la hora seis para TDCA. Finalmente, las cepas ATCC no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre medias para ninguno de los tres sustratos ( $\alpha=0.05$ ).

#### **5.6. Análisis de la expresión de la enzima BSH en la cepa *L. fermentum* ATCC 9338**

La expresión de la enzima BSH fue evaluada durante la fase exponencial en las cepas de *L. fermentum*, tomándose la cepa *L. fermentum* ATCC 9338 como modelo para el análisis de RNAm (ácido ribonucleico mensajero). La expresión de la enzima se realizó durante las primeras seis horas de crecimiento empleando como gen house keeping el gen 16S rRNA (Duary, *et al.*, 2012).

Se evaluó la expresión del *gen bsh* en respuesta a dos condiciones fisiológicas: oxígeno y sales biliares, siendo cuatro las posibles interacciones entre ellas: i) S1: Sin Sales Biliares y en condiciones de aerobiosis, ii) S2: Con Sales Biliares y en condiciones de aerobiosis, iii) S3: Sin Sales Biliares y en condiciones de anaerobiosis, y, iv) S4: Con Sales Biliares y en condiciones de anaerobiosis. La expresión enzimática relativa se realizó cuantificando

la intensidad de banda del gen 16S rRNA (700-800 pb) y del *gen bsh* (638 pb); y determinando la relación entre ellos. (Figura No. 10)

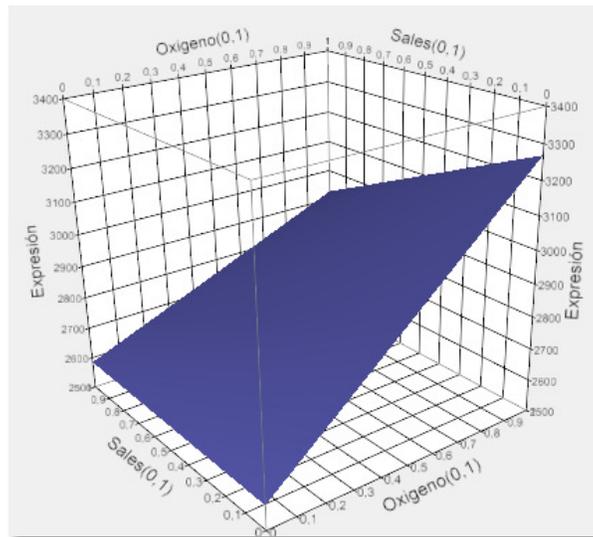


**Figura 3.** Expresión génica de la enzima BSH para la cepa *L. fermentum* ATCC 9338. La **Figura 10-A** y **Figura 10-B**, muestra la expresión del gen *bsh* (600 pb) y del gen house keeping (800pb) durante las primeras horas de crecimiento bacteriano en presencia de los diferentes tratamientos S1: Sin Sales Biliares y en condiciones de aerobiosis, S2: Con Sales Biliares y en condiciones de aerobiosis, S3: Sin Sales Biliares y en condiciones de anaerobiosis y S4: Con Sales Biliares y en condiciones de anaerobiosis. La **Figura 10-C** muestra la cinética de expresión del gen *bsh* para cada tratamiento.

La expresión de la enzimática inició a la hora dos, para los cuatro tratamientos. La expresión del gen *bsh* para cada uno de los tratamientos en los diferentes tiempos fue

variable, lo cual mostró diferencias estadísticamente significativas al realizar un análisis de variancia ( $\alpha=0.05$ ).

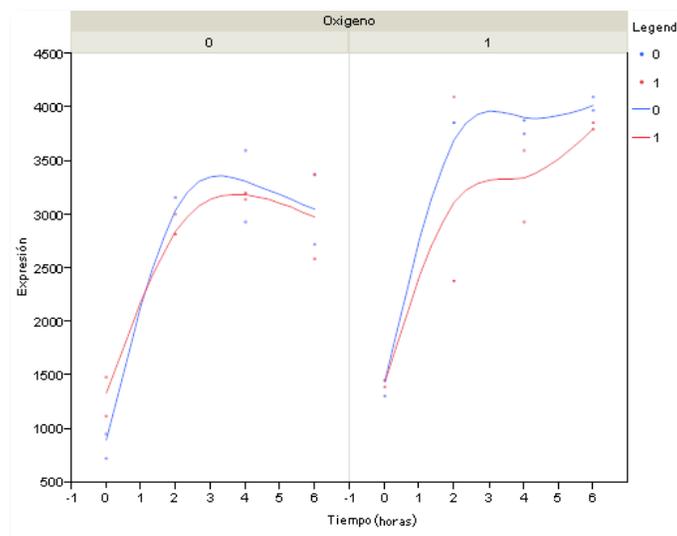
La Figura No. 11 muestra la interacción entre la expresión de la enzima, la presencia de oxígeno y la concentración de sales biliares. Se observa que existe una relación directamente proporcional entre ellas, al estar el microorganismo en presencia de sales y oxígeno se genera mayor síntesis de RNAm del *gen bsh*. Cuando hay presencia de sales y ausencia de oxígeno o cuando hay ausencia de los dos factores, disminuye la expresión de RNAm. Sin embargo, en condiciones de aerobiosis y en ausencia de sales biliares aumenta la expresión aunque en una proporción menor que en presencia de las dos condiciones, concluyendo que probablemente el factor más influyente para la expresión de la enzima es la presencia de oxígeno.



**Figura 4.** Diagrama Superficie de respuesta para la interacción entre las variables incidentes en la expresión del *gen bsh*

La Figura No. 12 muestra el comportamiento de la expresión génica durante el tiempo junto con la influencia de las variables. Se observa un comportamiento similar de expresión cuando se somete a condiciones de anaerobiosis y hay ausencia/presencia de

sales biliares, el pico máximo de expresión es a las dos horas y se presenta un descenso posterior en la expresión. Por el contrario, se observa un comportamiento ascendente de expresión después de las dos primeras horas de crecimiento indicando que probablemente se continúa sintetizando RNAm después de las seis horas, en ausencia/presencia de sales biliares y en condiciones de aerobiosis, sin embargo, en presencia de los dos factores la pendiente del incremento de expresión es mayor, indicando que probablemente la presencia de las sales biliares, es el factor que mantiene la síntesis de RNAm constante si el microorganismo así lo requiere.



**Figura 5.** Grafica de Diferentes tiempos, evaluación de la expresión enzimática en función del tiempo. Línea roja representa presencia de sales biliares, y la línea azul ausencia de sales biliares

De forma complementaria se determinó la actividad enzimática de la cepa *L. fermentum* ATCC 9338 por HPLC durante el mismo periodo de tiempo. El índice de correlación de Pearson mostró que no hay relación entre la expresión génica y la actividad enzimática ( $P > 0.05$ ), porque la cepa no presentó actividad durante las primeras horas de crecimiento.

## 6. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue contribuir al entendimiento de la enzima BSH en la especie *L. fermentum* y su influencia sobre el metabolismo catabólico del colesterol, el cual genera un impacto sobre la salud del consumidor, que puede ser empleado a futuro como posible probiótico en diferentes matrices alimenticias funcionales.

Las especies más estudiadas como probióticos en el género *Lactobacillus* son *L. acidophilus* y *L. plantarum*. Reportes recientes han demostrado que la cepa más empleada en modelos animales y en humanos es *L. acidophilus* como tratamiento para disminuir el colesterol sérico (Tabla No. 1). Por esta razón, se decidió complementar el estudio realizando nuevos aislamientos, provenientes de matrices lácteas enfocados en la búsqueda de *L. acidophilus* y adicionalmente realizar análisis comparativos sobre características hipocolesterolémicas entre especies.

Las cepas aisladas empleando el medio MRS selectivo fueron evaluadas en cuanto a sus propiedades probióticas: tolerancia p.H 2.0 y 0.3% de sales biliares y, sensibilidad a antibióticos. De acuerdo con el análisis de resistencia a pH 2.0 y tolerancia a sales biliares 0.3%, condiciones que afectan la supervivencia bacteriana en su paso a través de un modelo *in vitro* del tracto gastrointestinal durante las 2 horas que tarda el bolo alimenticio en atravesar el sistema (Macfarlane & Dillon, 2007), se observó que el 50% de las cepas estudiadas fueron capaces de sobrevivir a las condiciones propuestas por el estudio. Los resultados presentados en la Tabla No.3 son consistentes con los reportados por Vizoso y colaboradores, 2006, quienes evaluaron el comportamiento de las cepas de *Lactobacillus* aisladas de heces en niños y en Kulenaoto y Kwerionik (productos lácteos fermentados típicos de Kenia, África) en las mismas condiciones propuestas por este estudio, donde se

observó una disminución entre 2 y 3 unidades logarítmicas respectivamente. Es de considerar que estas dos variables son críticas en la selección de microorganismos como potenciales probióticos, puesto que afectan directamente la viabilidad del microorganismo en el hospedero (Cebeci y Gürakan, 2003), razón por la cual fueron las primeras en ser evaluadas.

Una vez las cepas superan el paso por el estómago atraviesan el intestino delgado, en donde la concentración promedio de sales biliares es de 0.3% (Xie *et al.*, 2011), la sobrevivencia de los aislamientos depende de características bioquímicas y moleculares; la cepa L1-4 disminuyó en 4.4 ciclos logarítmicos, concordante con lo reportado por Zago y colaboradores (2011) que al realizar la simulación del paso de las cepas de *L. plantarum* por el duodeno observan una disminución de 3 unidades logarítmicas.

El efecto de los microorganismos probióticos depende del potencial de la cepa y de la concentración en la cual se ingiere, por tanto, los resultados presentados en este estudio sugieren que cepas como L1-4 o S7-2b pueden tolerar un pH bajo sin pérdidas significativas de células durante el paso a través del estómago, como lo reporta Kaushik y colaboradores (2009) en su estudio bajo condiciones similares a las aquí empleadas.

En este estudio el 50% de las cepas estudiadas mostraron sensibilidad frente a la eritromicina, el 41% hacia el cloranfenicol y el 33% no mostraron resistencia a la tetraciclina y clindamicina, sin embargo, se hace evidente la resistencia presentada hacia los demás antibióticos. Algunos estudios han demostrado que el género *Lactobacillus* pueden presentar sensibilidad natural frente a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas, como cloramfenicol, eritromicina, clindamicina y tetraciclina (Jamaly, Benjouad,

& Bouksaim, 2011), y se ha observado que pueden presentar resistencia natural a vancomicina, gentamicina y fluoroquinolonas (Liu, Zhang, Dong, Yuan, & Guo, 2009) lo anterior es consistente con los resultados obtenidos.

La alta resistencia de las cepas aisladas a partir de productos lácteos, como las aquí encontradas son consistentes con lo reportado por Hleba, Kačániová, Pavelková, & Čuboň, 2012 en donde muestran que el 30.95% de los aislamientos presentaron resistencia a la ampicilina y 21.42% hacia la eritromicina, la resistencia la adjudican al manejo inadecuado de antibióticos en el ganado y concluyen que se transfiere de cepas patógenas (*E.coli*, por ejemplo) a cepas no patógenas afectando no solo a los animales sino también a los productos alimenticios obtenidos de éste. El Decreto 1500 del 2007 emitido por el Ministerio de Protección Social, hace referencia sobre las Buenas Prácticas en el Uso de Medicamentos Veterinarios (BPMV).

El proceso de aislamiento y caracterización probiótica mostró que solo el aislamiento S7-2b toleró condiciones de pH 2.0, 0.3% de sales biliares y no mostró resistencia ante los antibióticos de importancia epidemiológica evaluados, lo que permite sugerir que esta cepa presenta características probióticas.

La cepa S7-2b se identificó molecularmente como *L. fermentum* mediante secuenciación del gen 16S rRNA. Dado que los métodos tradicionales de identificación pueden dar resultados ambiguos se hace necesario el uso de métodos moleculares que disminuyan el error y permitan una identificación más confiable como PCR, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), RAPD(random amplified polymorphic DNA), RFLP (restriction fragment length polymorphism), entre otros (Baratto, Gelinski, Debastiani, & Dalbó, 2012).

La secuenciación del gen 16S rRNA, ha permitido la identificación de cepas del género *Lactobacillus* hasta especie a partir de diferentes fuentes. Por ejemplo, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. fermentum* aislados de leche de cabra cruda, han sido identificados molecularmente mediante análisis bioinformático del gen 16S rRNA (Kullen, Sanozky-Dawes, Crowell, & Klaenhammer, 2000; Marroki, Zúñiga, Kihal, & Martínez, 2011).

De acuerdo con la revisión bibliográfica y el estado del arte realizados en este trabajo, se observó que en la especie *L. fermentum*, la enzima BSH ha sido escasamente estudiada a nivel bioquímico y molecular en comparación con las cepas *L. acidophilus* y *L. plantarum*, de tal forma que la información obtenida durante este proceso de investigación es un aporte significativo al conocimiento sobre las características de esta cepa.

Por otra parte, la evaluación bioquímica del potencial hipocolesterolémico se le realizó a la cepa la *L. fermentum* S7-2b y a las aisladas en estudios previos (Acuña, 2009). Tres de las seis cepas mostraron actividad enzimática BSH en la evaluación cualitativa y cuantitativa siendo concordante con la presencia molecular del gen *bsh* (Figura No. 6), además todas las cepas adsorbieron colesterol.

La evaluación cualitativa de las cepas estudiadas mostró resultados consistentes con los presentados por Moser y Savage (2001), quienes realizaron 15 aislamientos de 9 diferentes especies del género *Lactobacillus* a partir de matrices lácteas, evaluaron la actividad de la enzima BSH en placa y observaron que cinco cepas presentaban actividad frente a las sales conjugadas con taurina o glicina, esta característica la adjudican al tipo de gen codificante y al origen del microorganismo.

Los resultados obtenidos en este estudio para la evaluación cuantitativa son comparables con los estudios realizados por Jiang y colaboradores (2010), en donde las cepas aisladas de *L. fermentum* mostraron mayor actividad por sales conjugadas con taurina que por las de glicina, de igual forma la cepa control *L. acidophilus* ATCC 4356 mostró similar actividad al control de este estudio. Los aislamientos realizados por Liong y colaboradores (2005) y por Tanaka y colaboradores (2000), presentaron actividades enzimáticas tanto para cepas del género *Lactobacillus* como para cepas del género *Bifidobacterium*, similares a las reportadas en la Tabla No. 6.

Es de resaltar, que en la evaluación cuantitativa y cualitativa se observó que los microorganismos utilizan la enzima como un mecanismo para la obtención de nutrientes, lo cual se puede deducir al observar que a las 10 horas los microorganismos utilizan como fuente de sustrato una o dos de las sales biliares, sin embargo a las 72 horas se observa una mayor actividad con un sustrato diferente. Lo anterior es concordante con lo expuesto por Pereira y colaboradores (2003) quienes afirman que los microorganismos sintetizan la enzima BSH cuando se encuentra en fase estacionaria (después de 10 horas promedio de crecimiento en las cepas estudiadas), en esta fase, los componentes nutricionales empiezan a disminuir, siendo la limitante de sustrato un estímulo para su síntesis. Los aminoácidos liberados podrían ser utilizados como fuente de carbono y nitrógeno, la glicina puede ser metabolizada a amoníaco y dióxido de carbono, y la taurina a amoníaco, dióxido de carbono y sulfato (Begley, *et al.*, 2006).

La variabilidad de la actividad presentada por las cepas (evaluación cualitativa y cuantitativa) puede deberse a dos factores: i) La enzima se sintetiza durante la fase estacionaria periodo en el cual los nutrientes disminuyen, siendo la limitante de sustrato

un estímulo para su síntesis y ii) la tolerancia de los microorganismos hacia la toxicidad de los ácidos biliares producto de la hidrólisis de las sales biliares.

Las sales biliares presentes en el duodeno ejercen actividad antimicrobiana al ocasionar efectos nocivos como mal plegamiento y desnaturalización de proteínas, daño en el ADN, errores en la transcripción de RNA y acidificación intracelular (Fang *et al.*, 2009; Koskenniemi *et al.*, 2011). Sin embargo, los ácidos biliares son más tóxicos para los microorganismos que las sales biliares (Patel, Singhanian, Pandey, & Chincholkar, 2010). La microflora intestinal al desconjugar las sales biliares es afectada por las nuevas concentraciones de ácido cólico presentes en el ambiente; si la tolerancia hacia éstos ácidos es menor, no se va a sintetizar la enzima BSH, pues está condicionada por la cantidad de sales presentes y por la resistencia del microorganismo hacia las concentraciones de producto (Koskenniemi, *et al.*, 2011), lo que puede explicar la variabilidad en cuanto a la actividad enzimática encontrada en los aislamientos provenientes de suero costeño.

De igual manera las sales biliares son el producto final de la degradación del colesterol. Cuando la concentración de éstas disminuye por la acción de la enzima BSH en el intestino delgado, se hace imperativo la formación de nuevas sales (Cardona, *et al.*, 2000; Martoni, *et al.*, 2007). Al prevalecer los microorganismos productores de la enzima BSH, habrá mayor influencia en el metabolismo del colesterol y posteriormente en la reducción de colesterol sérico (Liong & Shah, 2005). El género *Lactobacillus*, es el responsable de sintetizar entre el 75 y 80% de BSH en el intestino (Kumar, *et al.*, 2011) , por tanto, al ser empleadas estas cepas en matrices alimentarias se estaría aportando de manera significativa en la disminución de colesterol sérico.

Todos los aislamientos presentaron actividad frente a taurocolato y taurodeocolato de sodio, sales conjugadas con taurina. La relación entre los conjugados de taurina y conjugados de glicina es de 3:1 en adultos sanos, y esta relación varía según la dieta y la concentración de taurina presente en el hígado (Shao & Hathcock, 2008). Estas sales biliares a diferencia de las conjugadas con glicina poseen un efecto protector hacia la colestasis (Cao *et al.*, 2010). La taurina, producto de la desconjugación, promueve el flujo biliar al aumentar su concentración en respuesta al mantenimiento del equilibrio homeostático y en el sistema cardiovascular previene alteraciones en el ritmo cardiaco atenuando el efecto de la angiotencina II (Lourenço & Camilo, 2002). Lo anterior indica, que se estaría aportando de forma indirecta en el mantenimiento de las sales biliares y en el sistema cardiovascular, como efectos complementarios al de interés en este estudio.

Por otra parte, se puede sugerir que el proceso de adsorción está relacionado con la actividad enzimática, aunque es un proceso físico, las cepas con actividad enzimática mostraron mayor adsorción de colesterol. La adsorción de colesterol es un proceso limitado por las necesidades de fortalecimiento de la membrana bacteriana dadas por la adversidad del medio, (Dambekodi, 1998; Kimoto y col, 2002). Los ácidos biliares, a diferencia de las sales biliares, poseen baja capacidad emulsionante de los lípidos, su incremento en el intestino, sin ser evacuados de forma oportuna, se asocia a esteatorrea y cálculos biliares (J.M. Ridlon, D.J. Kang, & P.B. Hylemon, 2006). Existe relación entre la actividad enzimática y la adsorción de colesterol, al aumentar la actividad enzimática, aumenta la adsorción de colesterol, debido que el aumento de ácido cólico es tóxico para el microorganismo, y obliga a éste a fortalecer su membrana celular como mecanismo de defensa (Noh, Kim, & Gilliland, 1997). Además, el incremento de éste ácido no permite la solubilización del colesterol en el intestino y su posterior absorción, generando a largo

plazo el posible desarrollo de cáncer de colon, por tanto, la incorporación de la molécula a la membrana celular, contribuye de forma indirecta a mantener el equilibrio lipídico en el lumen intestinal (Corzo & Gilliland, 1999a).

La identificación molecular de la enzima BSH en las cepas se realizó para generar nuevo conocimiento para la especie *L. fermentum* a partir de las cepas estudiadas. La presencia del gen *bsh* se considera una ventaja evolutiva en la supervivencia y colonización en el intestino delgado, debido a que las sales biliares son tóxicas para los microorganismos, razón por la cual el gen *bsh* se transfiere entre la microbiota intestinal como un mecanismo de resistencia, fenómeno comparable con el paso de genes de resistencia hacia antibióticos (Hamelin *et al.*, 2007; R. Kumar, S. Grover, & V. K. Batish, 2011); Tannock y colaboradores (1989) describieron la presencia de plásmidos en *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, y *L. fermentum*, y un mecanismo similar de transferencia de genes se ha observado en *Listeria monocytogenes* (Dussurget *et al.*, 2002).

En este estudio, el análisis filogenético mostró que existe alta divergencia del gen *bsh* entre las especies del género *Lactobacillus*, observándose que la especie *L. fermentum* proviene de una rama evolutiva diferente a las demás especies. Como se ha reportado, el gen *bsh* se transfiere de forma horizontal y sólo las cepas del tracto gastrointestinal lo poseen considerándose como un rasgo evolutivo de la microflora de mamíferos. Por esta razón, se puede sugerir que la variabilidad génica puede estar dada por deleciones a las que haya estado expuesto el plásmido durante su transferencia.

Los resultados hallados son consistentes con los presentados por Jiang y colaboradores (2010), quienes clonaron y secuenciaron el gen *bsh* de 16 aislamientos de origen

humano, en donde se resaltan alta homología, superior al 45%, y adjudican la variabilidad genética a las posibles deleciones a las cuales ha sido expuesto el plásmido por ser trasferido de forma horizontal. Lo anterior, fue postulado inicialmente por Leer y colaboradores (1993), quienes estudiaron la estabilidad fenotípica de la enzima BSH en *L. plantarum*. Fang y colaboradores (2009), soportan dichos postulados y atribuyen las deleciones a una disminución en la actividad enzimática (Fang, *et al.*, 2009). McAuliffe y colaboradores (2005), teniendo como objeto de estudio los genes *bsha* y *bshb* de *L. acidophilus*, plantean dos posibles hipótesis para explicar la variabilidad génica entre la misma especie: i) *bsha* y *bshb* pudieron originarse de diferentes fuentes, o, ii) el surgimiento de los genes a partir de la duplicación, los cuales divergieron para codificar enzimas con especificidad hacia sustratos diferentes (McAuliffe *et al.*, 2005).

Es de resaltar que las cepas *L. fermentum* K72 y *L. fermentum* ATCC 9338 presentaron la mayor homología (99%) aunque provienen de lugares geográficos diferentes y se esperarían comportamientos contrarios, sin embargo, al comparar la actividad cualitativa de las cepas, se observa que ambas presentan actividad frente a las sales conjugadas con taurina, pero la cepa *L. fermentum* ATCC 9338 presenta una actividad mucho menor frente a glucolato de sodio, lo cual puede indicar que su actividad está condicionada a los estímulos previos, como una mayor estancia en el tracto gastrointestinal antes de su aislamiento (Oh *et al.*, 2008).

Los estudios realizados por HPLC de actividad enzimática durante la fase exponencial mostraron que la actividad inicia después de la segunda hora para todas las cepas, sin embargo, su comportamiento varía en cada aislamiento. Estos comportamientos pueden estar asociados a una adaptación por las condiciones adversas del medio, la cual va a

dependen de la predisposición de las cepas y la tolerancia de las mismas. Durante esta fase se estudió también la expresión del *gen bsh* y se observó que inicia a las 2 horas en donde la presencia de sales estimula su expresión, sin embargo, la mayor expresión se da en presencia de oxígeno, lo cual es un nuevo hallazgo para el estudio del *gen bsh* en *L. fermentum*.

La actividad enzimática determinada por HPLC y medida durante la fase exponencial presentó una variabilidad que puede asociarse a la posibilidad de usar la enzima en base a su función de fortalecimiento de membrana. En el duodeno, enzimas como fosfolipasa A2 o defensinas contribuyen a la actividad antimicrobiana del intestino ocasionando daño en la membrana microbiana (Taranto, Fernandez Murga, Lorca, & de Valdez, 2003). Cada uno de los microorganismos procede de lugares distintos, y como se discutió anteriormente, la cepa *L. fermentum* K73 es la más distante genéticamente y la que mayor actividad enzimática presenta, esto puede deberse a que ha estado en el tracto gastrointestinal más tiempo o su presencia en el suero costeño se asocia a contaminación oro-fecal en alguna de las fases de elaboración del producto o en la materia prima.

El análisis de la expresión del *gen bsh* a las dos horas también fue reportado por Daury y colaboradores (2012) asociado a la síntesis de la enzima BSH funcional, durante la segunda hora de crecimiento para *L. plantarum*, de igual forma, Koskenniemi y colaboradores (2011) evaluaron el transcriptoma de la cepa *L. rhamnosus* en presencia de 0.3% oxgall (mezcla de sales biliares). Como se mostró en el análisis filogenético el *gen bsh* es diferente entre las especies del género *Lactobacillus*, sin embargo, su momento de expresión es el mismo, siendo ésta una similitud en cuanto a su función fisiológica para el microorganismo indicando lo necesario que es este *gen* para el

desarrollo del microorganismo. Sin embargo, algunos autores atribuyen la expresión a la concentración de sales presentes en el medio, se ha observado que la cepa *L. acidophilus* NCMF no muestra expresión diferencial para ninguno de sus dos genes cuando es sometida a éste factor de estrés (Pfeiler, Azcarate-Peril, & Klaenhammer, 2007). Por otro lado, algunos autores evalúan la expresión génica únicamente en aerobiosis y variando la concentración de sales biliares, considerándose éste factor como causal de síntesis de RNAm, no obstante, al simular *in vitro* las condiciones reales del intestino delgado se hace necesario contemplar que el sistema es anaeróbico (Martoni, *et al.*, 2007), razón por la cual se incluyó dicha variable en este estudio.

Finalmente, la falta de correlación entre la expresión del gen *bsh* y la actividad enzimática por HPLC puede deberse a su origen. *L. fermentum* ATCC 9338 es una cepa referencia aislada del tracto urogenital (Reid *et al.*, 1992) probablemente no estuvo durante mucho tiempo condicionada a factores estresantes como la presencia de sales biliares, insinuando que el microorganismo sintetiza la enzima en fase estacionaria no como mecanismo de resistencia ante la hostilidad del medio, sino como una alternativa para la obtención de nutrientes.

En conclusión, las cepas *L. fermentum* evaluadas pudieron desconjugar las sales biliares y adsorber el colesterol *in vitro* como medida de su efecto hipocolesterolémico. Al ser caracterizadas como potenciales probióticos indica que se garantiza la seguridad del consumidor y se generan beneficios para su salud. Además, se pudo determinar que los microorganismos utilizan la enzima desde la fase exponencial hasta la fase estacionaria, enfocando su uso a las necesidades de adaptación u obtención de nutrientes. Por lo anterior, la síntesis de la enzima BSH genera beneficios al consumidor y al

microorganismo, razón por la cual, la continuidad de su estudio permitirá generar mecanismos para potencializar su producción *in vivo* y de esta forma generar un impacto duradero sobre la salud del consumidor.

## 7. CONCLUSIONES

- ▶ Las cepas provenientes de alimentos de origen animal como suero costeño o leche cruda, poseen una alta resistencia frente a los antibióticos de importancia epidemiológica, debido a las malas prácticas en el uso de medicamentos veterinarios, o por contaminación cruzada con seres humanos, en donde se observaría resistencia originada por la formulación inadecuada de éstos.
- ▶ La presencia de la enzima BSH en los aislamientos, considerada exclusiva de los microorganismos colonizadores del tracto gastrointestinal, indica que la materia prima o alguna fase del proceso de elaboración del producto estuvo en contacto con material fecal.
- ▶ El *gen bsh* de las cepas *L. fermentum* deriva de una rama evolutiva diferente a los genes reportados de especies como *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, evidenciado en el árbol filogenético y en los bajos porcentajes de identidad.
- ▶ Las cepas *L. fermentum* K72 y *L. fermentum* ATCC 9338, mostraron un comportamiento similar en cuanto a actividad enzimática. Ninguna mostró actividad frente a GCA durante las primeras seis horas de crecimiento y en la fase estacionaria (cuantificación de la actividad mediante la técnica de ninhidrina), esto puede deberse a la similitud genética presentada, con 99% de identidad.
- ▶ El estudio mostró que la cepa con mayor potencial hipocolesterolémico proveniente de suero costeño, producto lácteo fermentado artesanal colombiano, fue *L. fermentum* K73. Ésta constituye una alternativa para las personas que debido a niveles altos de colesterol sérico se encuentran en riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

- ▶ La presencia de oxígeno es el factor más incidente en la expresión del gen *bsh* en lugar de la presencia de sales biliares como lo sugieren otros estudios y su expresión inicia en la segunda hora de crecimiento.
- ▶ Microorganismos con las dos capacidades (producción de la enzima BSH y adsorción del colesterol) tendrían un mayor efecto sobre los niveles de colesterol del hospedero, puesto que se vería intervenido por dos mecanismos complementarios.
- ▶ El estudio de la actividad de la enzima BSH, no solo puede considerarse como una de las características probióticas de mayor influencia sobre la salud del consumidor a largo plazo, sino también, puede ofertarse como una medida biológica alternativa a las intervenciones farmacéuticas para prevenir y tratar la hipercolesterolemia.

## 8. RECOMENDACIONES

- ▶ Este estudio mostró que parte de las condiciones para la expresión de la enzima BSH es la presencia de sales biliares en el medio, sin embargo no hay investigaciones en donde se describa el mecanismo de regulación de la enzima, que puede conducir a un mejor entendimiento sobre la relación huésped-microorganismo, razón por la cual se propone profundizar en dicho conocimiento.
- ▶ Se debe continuar con la investigación en modelos murinos, como última etapa para la selección de una cepa probiótica, de tal forma que se contrasten los resultados obtenidos *in vitro* y los resultados *in vivo*, para iniciar el desarrollo de matrices alimentarias enriquecidas con estos aislamientos, y aportar de forma directa a la salud del consumidor.
- ▶ Las cepas del género *Lactobacillus*, tienen la capacidad de producir ácidos, como el ácido láctico, y otras sustancias de interés industrial. Razón por la cual, se propone continuar con su estudio, inclusive las que fueron resistentes a antibióticos que por ello no podrían ser consideradas como probióticos.
- ▶ El estudio de la enzima BSH procedente de *L. fermentum* se encuentra en desarrollo, como la enzima presenta afinidad hacia dos sustratos diferentes se propone continuar con estudios sobre su estructura tridimensional para así identificar cuáles son sus sitios de actividad catalítica y poder realizar una correcta caracterización de la misma.

## 9. REFERENCIAS

Acuña, Y. (2009). Selección e identificación bacterias ácido lácticas (BAL) con potencial probiótico aisladas del suero costeño., Universidad de La Sabana.

Anderson, J. W., & Gilliland, S. E. (1999). Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr*, 18(1), 43-50.

Andrade, S., & Borges, N. (2009). Effect of fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* on plasma lipids of women with normal or moderately elevated cholesterol. *J Dairy Res*, 76(4), 469-474.

Aries, V., & Hill, M. J. (1970). Degradation of steroids by intestinal bacteria I. Deconjugation of bile salts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 202(3), 526-534.

Bao, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., *et al.* (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695-701.

Bateup, J. M., McConnell, M. A., Jenkinson, H. F., & Tannock, G. W. (1995). Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1147-1149

Baratto, C., Gelinski, J., Debastiani, J., & Dalbó, M. (2012). Molecular and phenotypic characterization of *Lactobacillus curvatus* isolated from handmade Brazilian salami. *African Journal of Biotechnology*, 11:11724-11731

Begley, M., Sleator, R. D., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btIB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*, 73(2), 894.

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1729.

Belviso, S., Giordano, M., Dolci, P., & Zeppa, G. (2009). *In vitro* cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. *Dairy Sci. Technol*, 89, 7.

Bresson, J.-L., Flynn, A., Heinonen, M., Hulshof, K., Korhonen, H., Lagiou, P., *et al.* (2008). Scientific substantiation of a health claim related to LACTORAL (a combination of three probiotic strains: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) and living probiotic bacteria, pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006, *The EFSA Journal*, 862: 1-8

Cao, R., Cronk, Z. X., Zha, W., Sun, L., Wang, X., Fang, Y., *et al.* (2010). Bile acids regulate hepatic gluconeogenic genes and farnesoid X receptor via G( $\alpha$ )i-protein-coupled receptors and the AKT pathway. *J Lipid Res*, 51(8), 2234-2244.

Cardona, M. E., Vanay, V. d. V., Midtvedt, T., & Norin, E. (2000). Probiotics in gnotobiotic mice. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 12: 219 –224)

Chiu, C. H., Lu, T. Y., Tseng, Y. Y., & Pan, T. M. (2006). The effects of Lactobacillus-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(2), 238-245.

Christiaens, H., Leer, R. J., Pouwels, P. H., & Verstraete, W. (1992 ). Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from Lactobacillus plantarum by using a direct plate assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3792-3798

Chul-Cyu, H., Cho, J.-K., Chai, Y.-G., Ha, Y.-A., & Shin (2006). Purification and Characterization of Bile Salt Hydrolase from Lactobacillus plantarum CK 102. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1047–1052

Corzo, G., & Gilliland, S. (1999a). Bile Salt Hydrolase Activity of Three Strains of Lactobacillus acidophilus<sup>1</sup>. *Journal of dairy Science*, 82(3), 472-480.

Corzo, G., & Gilliland, S. (1999b). Measurement of Bile Salt Hydrolase Activity from Lactobacillus acidophilus Based on Disappearance of Conjugated Bile Salts<sup>1</sup>. *Journal of dairy science*, 82(3), 466-471.

Cueto, C., García, D., Garcés, F., & Cruz, J. (2007). Preliminary studies on the microbiological characterization of lactic acid bacteria in suero costeño, a Colombian traditional fermented milk product. *Rev Latinoam Microbiol*, 49: 12-18.

Dambekodi, P., & Gilliland, S. (1998). Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Bifidobacterium longum*. *Journal of dairy science*, 81(7), 1818-1824.

Darukaradhya, J., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2006). Selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 16: 439–445

Dashkevicz, M. P., & Feighner, S. D. (1989). Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 55:11-16

Dave, R. I., & Shah, N. P. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. *J Dairy Sci*, 79(9), 1529-1536.

Du Toit, M., Franz, C., Dicks, L., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., *et al.* (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 93-104.

Duary, R. K., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* gut conditions. *Mol Biol Rep*, 39(3), 2541-2552.

Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., *et al.* (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol*, 45(4), 1095-1106.

Elkins, C. A., Moser, S. A., & Savage, D. C. (2001). Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. *Microbiology*, 147(12), 3403.

Elkins, C. A., & Savage, D. C. (1998). Identification of genes encoding conjugated bile salt hydrolase and transport in *Lactobacillus johnsonii* 100-100. *Journal of bacteriology*, 180(17), 4344.

Fang, F., Li, Y., Bumann, M., Raftis, E. J., Casey, P. G., Cooney, J. C., *et al.* (2009). Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels. *Journal of bacteriology*, 191(18), 5743.

Fazeli, H., & Moshtaghian, J. M., Maryam Shirzadi, Mohamad. (2010). Reduction in serum lipid parameters by incorporation of a native strain of *Lactobacillus Plantarum* A7 in Mice Iranian. *Journal of Diabetes and Lipid Disorders*, 9:1-7

Food and Agriculture Organization of the United Nations, F. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, pp. 1-11

Fukushima, M., Yamada, A., Endo, T., & Nakano, M. (1999). Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on delta6-desaturase activity in the livers of rats fed a fat- and cholesterol-enriched. *Diet. Nutrition*, 15(5), 373-378.

Gokavi, S., Zhang, L., Huang, M. K., Zhao, X., & Guo, M. (2005). Oat-based Symbiotic Beverage Fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *casei*, and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of food science*, 70(4), M216-M223.

Gregory, R., Stephan, F., Ali, M., Wichai, A., Toshihiko, H., & S, L. S. (2011). High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries *Bull World Health Organ*, 89, 92–101. doi:10.2471/BLT.10.079947

Gulgez Gokce, Y., Mehmet, O., & Aslım, B. (2011). Identification of *Lactobacillus* strains from breast-fed infant and investigation of their cholesterol-reducing effects. *World J Microbiol Biotechnol*, 27: 2397–2406

Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., & Park, S. Y. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.

Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T. A., Fairbrother, J., *et al.* (2007). Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates

from Different Aquatic Ecosystems within the St. Clair River and Detroit River Areas  
*Applied And Environmental Microbiology* (Vol. 73, pp. 477–484).

Herrema, H., Meissner, M., van Dijk, T. H., Brufau, G., Boverhof, R., Oosterveer, M. H., *et al.* (2010). Bile salt sequestration induces hepatic de novo lipogenesis through farnesoid X receptor- and liver X receptor alpha-controlled metabolic pathways in mice. *Hepatology*, 51(3), 806-816.

Hong, K. S., Kang, H. W., Im, J. P., Ji, G. E., Kim, S. G., Jung, H. C., *et al.* (2009). Effect of probiotics on symptoms in korean adults with irritable bowel syndrome. *Gut Liver*, 3(2), 101-107.

Hoveyda, N., Heneghan, C., Mahtani, K. R., Perera, R., Roberts, N., & Glasziou, P. (2009). A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol*, 9, 15.

Huang, Y., & Zheng, Y. (2010). The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C 1-like 1 in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 103(4), 473-478.

Huijghebaert, S. M., Mertens, J., & Eyssen, H. J. (1982). Isolation of a bile salt sulfatase-producing *Clostridium* strain from rat intestinal microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(1), 185.

Isolauri, E., Rautava, S., Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., & Salminen, S. (2002). Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2(3), 263-271.

Jamaly, N., Benjouad, A., & Bouksaim, M. (2011). Probiotic Potential of Lactobacillus strains Isolated from Known Popular Traditional Moroccan Dairy Products. *British Microbiology Research Journal*, 1: 79-94

Jeun, J., Kim, S., Cho, S. Y., Jun, H. J., Park, H. J., Seo, J. G., *et al.* (2010). Hypocholesterolemic effects of Lactobacillus plantarum KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition*, 26(3), 321-330.

Jiang, J. K., Hang, X. M., Zhang, M., Liu, X. L., Li, D. T., & Yang, H. (2010). Diversity of bile salt hydrolase activities in different lactobacilli toward human bile salts. *Annals of Microbiology*, 60(1), 81-88.

Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M., & Marchesi, J. R. (2008). Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13580.

Jones, M. L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T., & Prakash, S. (2004). Microencapsulated genetically engineered Lactobacillus plantarum 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004, 61-69.

Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol*, 78(1), 80-88.

Kaushik, J. K., Kumar, A., Duary, R. K., Mohanty, A. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS One*, 4(12), e8099.

Kiessling, G., Schneider, J., & Jahreis, G. (2002). Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur J Clin Nutr*, 56(9), 843-849.

Kimoto, H., Ohmomo, S., & Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by lactococci. *Journal of dairy science*, 85(12), 3182-3188.

Kofi, A. (2005). *Objetivos De Desarrollo Del Milenio: Una Mirada Desde América Latina Y El Caribe*. Santiago de Chile: Naciones Unidas, pp. 1-357

Koskenniemi, K., Laakso, K., Koponen, J., Kankainen, M., Greco, D., Auvinen, P., *et al.* (2011). Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol Cell Proteomics*, 10(2), M110.002741.

Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., *et al.* (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res*, 2012, 902917.

Kumar, R., Grover, S., & Batish, V. (2011). Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague–Dawley rats. *British Journal of Nutrition* (pp. 561–573).

Kumar, R., Grover, S., Mohanty, A. K., & Batish, V. K. (2010). Molecular Cloning and Sequence Analysis of Bile Salt Hydrolase Gene (bsh) from *Lactobacillus plantarum* MBUL90 Strain of Human Origin. *Food Biotechnology*, 24: 215–226

Kumar, R. S., Brannigan, J. A., Prabhune, A. A., Pundle, A. V., Dodson, G. G., Dodson, E. J., *et al.* (2006). Structural and functional analysis of a conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* reveals an evolutionary relationship with penicillin V acylase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32516.

Kurdi, P., Van Veen, H. W., Tanaka, H., Mierau, I., Konings, W. N., Tannock, G. W., *et al.* (2000). Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane delta pH, in many lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6525.

Lambert, J. M., Bongers, R. S., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2008). Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Applied and environmental microbiology*, 74(15), 4719.

Lambert, J. M., Bongers, R. S., & Kleerebezem, M. (2007). Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology*, 73(4), 1126.

Lin, W. H., Hwang, C. F., Chen, L. W., & Tsen, H. Y. (2006). Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol*, 23(1), 74-81.

Liong, M. T., Dunshea, F. R., & Shah, N. P. (2007). Effects of a synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 on plasma lipid profiles and morphology of erythrocytes in hypercholesterolaemic pigs on high- and low-fat diets. *Br J Nutr*, 98(4), 736-744.

Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal*, 15(4), 391-398.

Liu, C., Zhang, Z. Y., Dong, K., Yuan, J. P., & Guo, X. K. (2009). Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed Environ Sci*, 22(5), 401-412

Lourenço, R., & Camilo, M. E. (2002). Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutr Hosp*, 17(6), 262-270.

Lundeen, S. G., & Savage, D. C. (1990). Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100. *Journal of bacteriology*, 172(8), 4171.

Lundeent, S. G., & Savage, D. C. (1992). Multiple Forms of Bile Salt Hydrolase from *Lactobacillus* sp. Strain 100-100. *Journal of Bacreriology*, 174.

Lye, H. S., Rahmat-Ali, G. R., & Liong, M. T. (2010). Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 20(3), 169-175.

Lye, H. S., Rusul, G., & Liong, M. T. (2010). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. [Article]. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1383-1392.

Macfarlane, S., & Dillon, J. F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 102(5), 1187-1196.

Marroki, A., Zúñiga, M., Kihal, M., & Martínez, G. (2011). Characterization of lactobacillus from algerian goat's milk based on phenotypic, 16srdna sequencing and their technological properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 112-116.

Martoni, C., Bhathena, J., Jones, M. L., Urbanska, A. M., Chen, H., & Prakash, S. (2007). Investigation of microencapsulated BSH active lactobacillus in the simulated human GI tract. *J Biomed Biotechnol*, 2007(7), 13684.

Martoni, C., Bhathena, J., Urbanska, A. M., & Prakash, S. (2008). Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81(2), 225-233.

Masuda, N., & Oda, H. (1983). 7 alpha-Dehydroxylation of bile acids by resting cells of an unidentified, gram-positive, nonsporeforming anaerobic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 45:456–462

McAuliffe, O., Cano, R. J., & Klaenhammer, T. R. (2005). Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4925.

Moreira, J. L., Mota, R. M., Horta, M. F., Teixeira, S. M., Neumann, E., Nicoli, J. R., *et al.* (2005). Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol*, 5, 15.

Moser, S. A., & Savage, D. C. (2001). Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 67(8), 3476-3480.

Nguyen, T. D. T., Kang, J. H., & Lee, M. S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 358-361.

Noh, D., Kim, S., & Gilliland, S. (1997). Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 431211. *Journal of dairy science*, 80(12), 3107-3113.

Oh, H.-K., Ji Yoon, L., Soo, J. L., Min, J. K., Geun-Bae, K., Jung, H. K., *et al.* (2008). Molecular Cloning and Characterization of a Bile Salt Hydrolase from *Lactobacillus acidophilus* PF01. *J. Microbiol. Biotechnol*, 18: 449–456

Oinonen, C., & Rouvinen, J. (2000). Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Science*, 9(12), 2329-2337.

Ooi, L. G., Ahmad, R., Yuen, K. H., & Liong, M. T. (2010). *Lactobacillus acidophilus* CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *Journal of dairy science*, 93(11), 5048-5058.

Ortua, S., Felisa, G. E., Marzotto, M., Deriu, A., Mollicottia, P., Sechia, L. A., *et al.* (2007). Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal*, 17: 1312–1320

Pant, N., Marcotte, H., Brüssow, H., Svensson, L., & Hammarström, L. (2007). Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. *BMC Microbiol*, 7, 86.

Patel, A. K., Singhania, R. R., Pandey, A., & Chincholkar, S. B. (2010). Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(1), 166-180.

Pereira, D. I. A., McCartney, A. L., & Gibson, G. R. (2003). An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4743.

Pfeiler, E. A., Azcarate-Peril, M. A., & Klaenhammer, T. R. (2007). Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol*, 189(13), 4624-4634.

Ramasamy, K., Abdullah, N., Wong, M. C. V. L., Karuthan, C., & Ho, Y. W. (2010). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 65-69.

Reid, G., Cuperus, P. L., Bruce, A. W., van der Mei, H. C., Tomeczek, L., Khoury, A. H., *et al.* (1992). Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. *Appl Environ Microbiol*, 58(5), 1549-1553.

Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*, 47(2), 241.

Roth, G. F., StephanMokdad , Ali Aekplakorn, Wichai Hasegawa, Toshihiko Lim, Stephen. (2010). High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 89, 9.

Salarmoini, M., & Fooladi, M. H. (2011). Efficacy of *Lactobacillus acidophilus* as Probiotic to Improve Broiler Chicks Performance. *J. Agr. Sci. Tech*, 13: 87-92.

Schaafsma, G., Meuling, W. J., van Dokkum, W., & Bouley, C. (1998). Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Eur J Clin Nutr*, 52(6), 436-440.

Shao, A., & Hathcock, J. N. (2008). Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regul Toxicol Pharmacol*, 50(3), 376-399.

Shih-Wen, S., Yi-Cheng, L., & Yih-Ming, W. (2006). Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 112–117.

Smet, I., Van Hoorde, L., Saeyer, N. D., Vande Woestyne, M., & Verstraete, W. (1994). *In vitro* Study of Bile Salt Hydrolase (BSH) Activity of BSH Isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 Strains and Estimation of Cholesterol Lowering through Enhanced BSH Activity, Microbial Ecology in Health & Disease. *Journal of Food Composition and Analysis*, 7: 315-329

Sridevi, N., Vishwe, P., & Prabhune, A. (2009). Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Research International*, 42(4), 516-520.

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2530-2535.

Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J., & Mierau, I. (2000). Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*---biochemical and genetic characterization. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2502.

Tannock, G., Tangerman, A., Schaik, A. V., & McConnell, M. (1994). Deconjugation of bile acids by lactobacilli in the mouse small bowel. *Source Appl Environ Microbiol*, (Vol. 60, pp. 3419-3420).

Tannock, G. W., Dashkevich, M. P., & Feighner, S. D. (1989). Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 55(7), 1848.

Taranto, M. P., Sesma, F., & Valdez, G. F. d. (1999). Localization and primary characterization of bile salt hydrolase from *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Letters*, 21, pp. 935-938.

Taranto, M. P., Fernandez Murga, M. L., Lorca, G., & de Valdez, G. F. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J Appl Microbiol*, 95(1), 86-91.

Thornton, G., O'Sullivan, M., O'Sullivan, G., Weerkamp, A., Shanahan, F., & Collins, J. (1995). Bile tolerance and bile salt hydrolase activity of lactobacilli and bifidobacteria isolated from the human intestine. *Gastroenterology*. A928

Vizoso Pinto, M. G., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2006). Lactobacillus spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International journal of food microbiology*, 109(3), 205-214

Wang, C. Y., Wu, S. C., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Effect of Lactobacillus-fermented adlay-based milk on lipid metabolism of hamsters fed cholesterol-enriched diet. *Food Research International*, 43(3), 819-824.

Wang, Y. M., Zhang, B., Xue, Y., Li, Z. J., Wang, J. F., Xue, C. H., *et al.* (2010). The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids Health Dis*, 9, 4.

Woo, P. C., Fung, A. M., Lau, S. K., & Yuen, K. Y. (2002). Identification by 16S rRNA gene sequencing of Lactobacillus salivarius bacteremic cholecystitis. *J Clin Microbiol*, 40(1), 265-267.

Woo, P. C., Ng, K. H., Lau, S. K., Yip, K. T., Fung, A. M., Leung, K. W., *et al.* (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol*, 41(5), 1996-2001.

Xie, N., Cui, Y., Yin, Y. N., Zhao, X., Yang, J. W., Wang, Z. G., *et al.* (2011). Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complement Altern Med*, 11, 53.

Yin, S., Zhai, Z., Wang, G., An, H., Luo, Y., & Hao, Y. (2011). A novel vector for lactic acid bacteria that uses a bile salt hydrolase gene as a potential food-grade selection marker. *J Biotechnol*, 152(1-2), 49-53.

Young, T. A., Geun, B. K., Kwang, S. L., Young, J. B., & Hyun, U. K. (2003). Deconjugation of bile salts by Lactobacillus acidophilus isolates. *International Dairy Journal*, 13: 303–311

Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., *et al.* (2011). Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. *Food Microbiol*, 28(5), 1033-1040

Zeng, X. Q., Pan, D. D., & Zhou, P. D. (2011). Functional Characteristics of Lactobacillus fermentum F1. *Current microbiology*, 62(1), 27-31.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Curvas de calibración para Glicina y Taurina

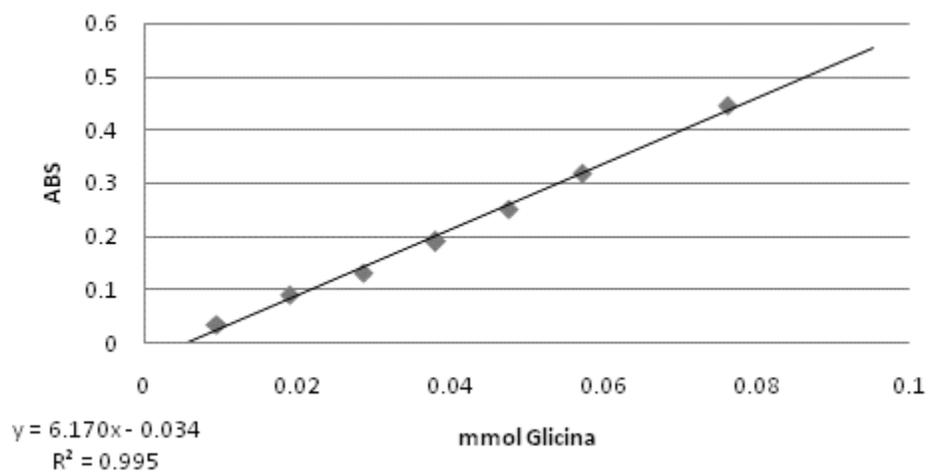


Figura 6 . Curva de calibración para Glicina

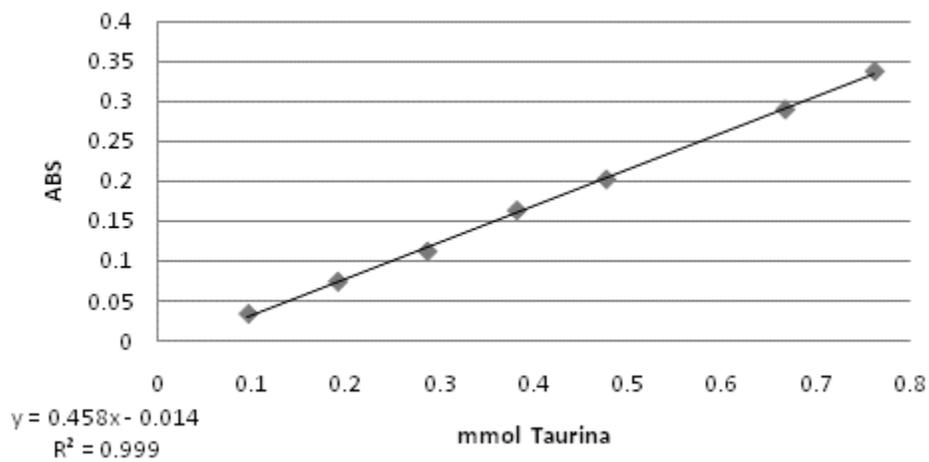


Figura 7. Curva de calibración para Taurina

## 10.2. Plantillas de validación estadística, curvas de calibración para glicina y taurina

Tabla 9 . Validación estadística: Curva de calibración Glicina

LINEALIDAD										
ncntración m <sub>j</sub>	Concentración Final	Abs	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	X-Y	Ŷ	Y-Ŷ	(Y-Ŷ) <sup>2</sup>	X-Xprom	(X-Xprom) <sup>2</sup>
8	0.076190476	0.713	0.005804989	0.508369	-0.636809524	0.03702381	0.67597619	0.45694381	0.036734694	0.00134944
8	0.076190476	0.718	0.005804989	0.515524	-0.641809524	0.03702381	0.68097619	0.46372857	0.036734694	0.00134944
8	0.076190476	0.715	0.005804989	0.511225	-0.638809524	0.03702381	0.67797619	0.45965171	0.036734694	0.00134944
6	0.057142857	0.446	0.003265306	0.198916	-0.388857143	0.03504286	0.41095714	0.16888577	0.017687075	0.00031283
6	0.057142857	0.453	0.003265306	0.205209	-0.395857143	0.03504286	0.41795714	0.17468817	0.017687075	0.00031283
6	0.057142857	0.446	0.003265306	0.198916	-0.388857143	0.03504286	0.41095714	0.16888577	0.017687075	0.00031283
5	0.047619048	0.321	0.002267574	0.103041	-0.273380952	0.03405238	0.28694762	0.08233894	0.008163265	6.6639E-05
5	0.047619048	0.322	0.002267574	0.103684	-0.274380952	0.03405238	0.28794762	0.08291383	0.008163265	6.6639E-05
5	0.047619048	0.317	0.002267574	0.100489	-0.269380952	0.03405238	0.28294762	0.08005936	0.008163265	6.6639E-05
4	0.038095238	0.248	0.001451247	0.061504	-0.209904762	0.0330619	0.2149381	0.04619838	-0.00136054	1.8511E-06
4	0.038095238	0.249	0.001451247	0.062001	-0.210904762	0.0330619	0.2159381	0.04662926	-0.00136054	1.8511E-06
4	0.038095238	0.256	0.001451247	0.065536	-0.217904762	0.0330619	0.2229381	0.04970139	-0.00136054	1.8511E-06
3	0.028571429	0.186	0.000816327	0.034596	-0.157428571	0.03207143	0.15392857	0.02369401	-0.01088435	0.00011847
3	0.028571429	0.188	0.000816327	0.035344	-0.159428571	0.03207143	0.15592857	0.02431372	-0.01088435	0.00011847
3	0.028571429	0.192	0.000816327	0.036864	-0.163428571	0.03207143	0.15992857	0.02557715	-0.01088435	0.00011847
2	0.019047619	0.131	0.000362812	0.017161	-0.111952381	0.03108095	0.09991905	0.00998382	-0.02040816	0.00041649
2	0.019047619	0.132	0.000362812	0.017424	-0.112952381	0.03108095	0.10091905	0.01018465	-0.02040816	0.00041649
2	0.019047619	0.134	0.000362812	0.017956	-0.114952381	0.03108095	0.10291905	0.01059233	-0.02040816	0.00041649
1	0.00952381	0.088	9.07029E-05	0.007744	-0.07847619	0.03009048	0.05790952	0.00335351	-0.02993197	0.00089592
1	0.00952381	0.088	9.07029E-05	0.007744	-0.07847619	0.03009048	0.05790952	0.00335351	-0.02993197	0.00089592
1	0.00952381	0.091	9.07029E-05	0.008281	-0.08147619	0.03009048	0.06090952	0.00370997	-0.02993197	0.00089592
<b>SUMATORIA</b>			0.042176871	2.820869	-5.704428571	1.10467143	5.42832857	2.40482219	-0.55238095	0.03127956
<b>PROMEDIO</b>	0.039455782									
Valor t 95%confianza: 1,729 (21 GRADOS DE LIBERTAD) n-2										
<b>Desvest Res</b>	0.338401156									
<b>Desvest Pen</b>	1.913381295									
<b>Desvest Int</b>	0.392951274									
<b>R</b>	0.997496867									
<b>t intercepto</b>	0.093650288	tcalculado<tteórico: el intercepto es estadísticamente igual a cero								
<b>t Pendiente</b>	3.2308772	tcalculado>tteórico: La pendiente es significativamente diferente de cero								
<b>Coef.corre</b>	54.24903452	tcalculado>tteórico: por lo que existe correlación entre Y-X								

Tabla 10. Validación estadística: Curva de calibración Taurina

LINEALIDAD										
ncntración m <sub>j</sub>	Concentración Final	Abs	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	X-Y	Ŷ	Y-Ŷ	(Y-Ŷ) <sup>2</sup>	X-Xprom	(X-Xprom) <sup>2</sup>
80	0.761904762	0.458	0.580498866	0.209764	0.303904762	0.1083381	0.3496619	0.12226345	0.353741497	0.12513305
80	0.761904762	0.291	0.580498866	0.084681	0.470904762	0.1083381	0.1826619	0.03336537	0.353741497	0.12513305
80	0.761904762	0.218	0.580498866	0.047524	0.543904762	0.1083381	0.1096619	0.01202573	0.353741497	0.12513305
70	0.666666667	0.247	0.444444444	0.061009	0.419666667	0.09843333	0.14856667	0.02207205	0.258503401	0.06682401
70	0.666666667	0.289	0.444444444	0.083521	0.377666667	0.09843333	0.19056667	0.03631565	0.258503401	0.06682401
70	0.666666667	0.333	0.444444444	0.110889	0.333666667	0.09843333	0.23456667	0.05502152	0.258503401	0.06682401
50	0.476190476	0.202	0.22675737	0.040804	0.274190476	0.07862381	0.12337619	0.01522168	0.068027211	0.0046277
50	0.476190476	0.19	0.22675737	0.0361	0.286190476	0.07862381	0.11137619	0.01240466	0.068027211	0.0046277
40	0.380952381	0.159	0.145124717	0.025281	0.221952381	0.06871905	0.09028095	0.00815065	-0.02721088	0.00074043
40	0.380952381	0.163	0.145124717	0.026569	0.217952381	0.06871905	0.09428095	0.0088889	-0.02721088	0.00074043
30	0.285714286	0.123	0.081632653	0.015129	0.162714286	0.05881429	0.06418571	0.00411981	-0.12244898	0.01499375
30	0.285714286	0.089	0.081632653	0.007921	0.196714286	0.05881429	0.03018571	0.00091118	-0.12244898	0.01499375
30	0.285714286	0.1	0.081632653	0.01	0.185714286	0.05881429	0.04118571	0.00169626	-0.12244898	0.01499375
20	0.19047619	0.063	0.036281179	0.003969	0.12747619	0.04890952	0.01409048	0.00019854	-0.21768707	0.04738766
20	0.19047619	0.076	0.036281179	0.005776	0.11447619	0.04890952	0.02709048	0.00073389	-0.21768707	0.04738766
20	0.19047619	0.084	0.036281179	0.007056	0.10647619	0.04890952	0.03509048	0.00123134	-0.21768707	0.04738766
10	0.095238095	0.024	0.009070295	0.000576	0.071238095	0.03900476	-0.01500476	0.00022514	-0.31292517	0.09792216
10	0.095238095	0.036	0.009070295	0.001296	0.059238095	0.03900476	-0.00300476	9.0286E-06	-0.31292517	0.09792216
10	0.095238095	0.042	0.009070295	0.001764	0.053238095	0.03900476	0.00299524	8.9715E-06	-0.31292517	0.09792216
<b>SUMATORIA</b>			4.571428571	0.779629	5.384428571	1.90992857	1.27707143	0.35762319	-5.71428571	3.40524781
<b>PROMEDIO</b>	0.408163265									
Valor t 95%confianza: 1,729 (21 GRADOS DE LIBERTAD) n-2										
<b>Desvest Res</b>	0.130497799									
<b>Desvest Pen</b>	0.070717814									
<b>Desvest Int</b>	0.151201046									
<b>R</b>	0.999499875									
<b>t intercepto</b>	0.24338456	tcalculado<tteórico: el intercepto es estadísticamente igual a cero								
<b>t Pendiente</b>	87.41644664	tcalculado>tteórico: La pendiente es significativamente diferente de cero								
<b>Coef.corre</b>	54.35796844	tcalculado>tteórico: por lo que existe correlación entre Y-X								

### 10.3. Curvas de crecimiento

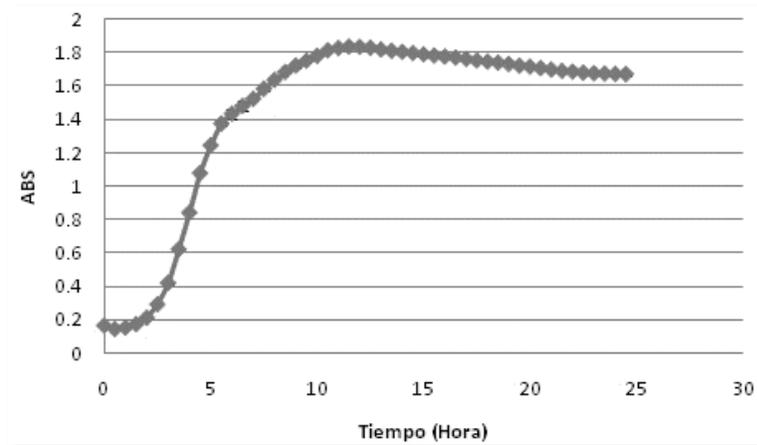


Figura 8. Curva de crecimiento cepa *L. fermentum* K 72.

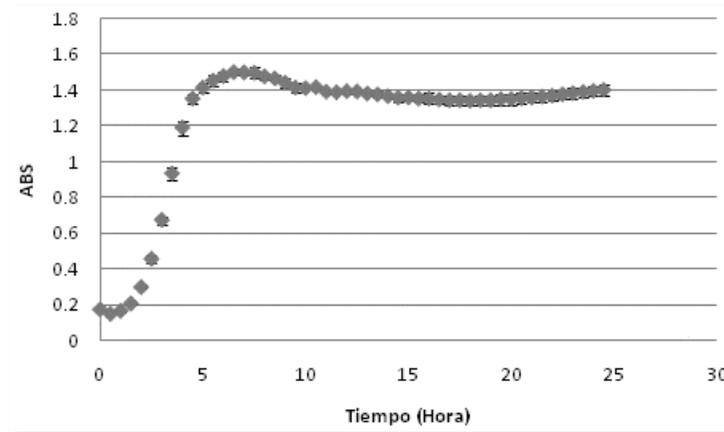
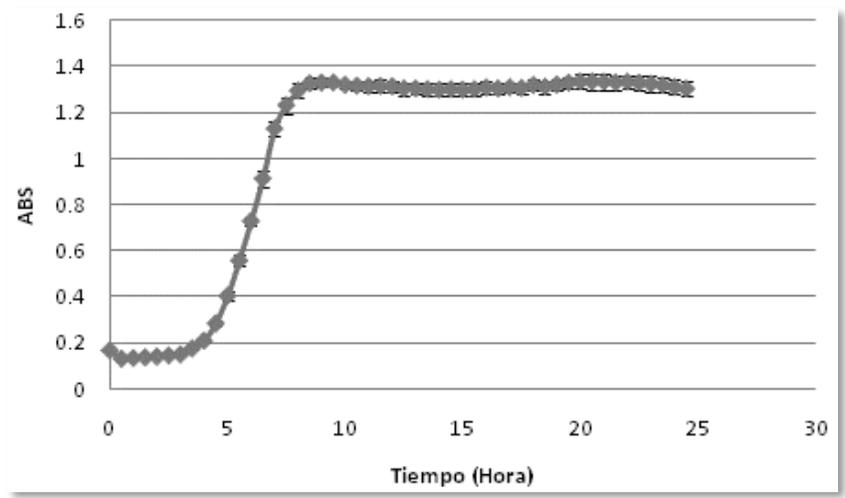
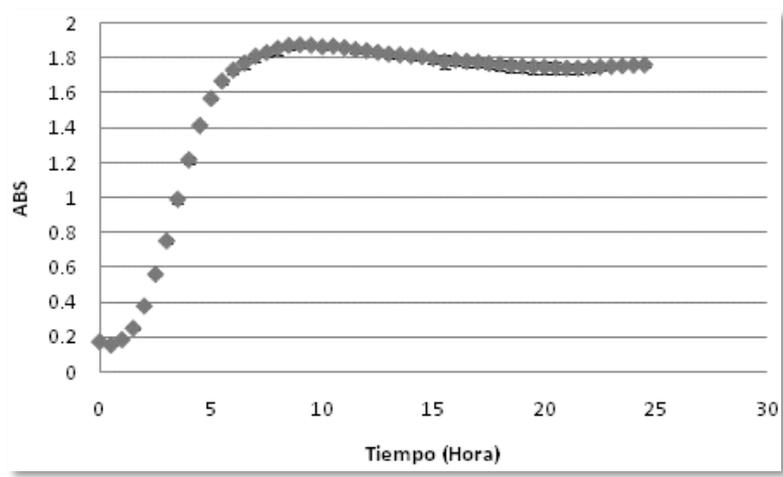


Figura 16. Curva de crecimiento cepa *L. fermentum* K73.



**Figura 17.** Curva de crecimiento cepa *L. fermentum* S7-2b.



**Figura 18.** Curva de crecimiento cepa *L. fermentum* ATCC 9338.

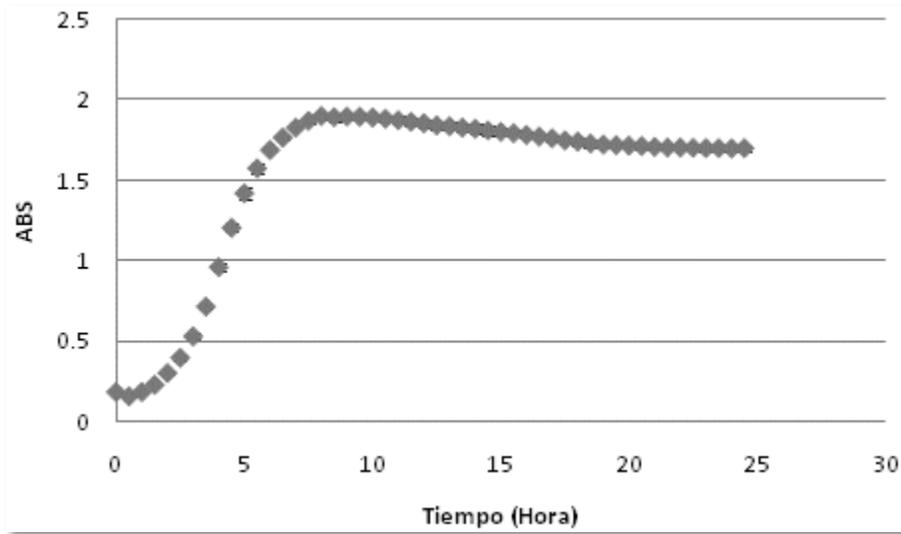


Figura 9. Curva de crecimiento cepa *L. acidophilus* ATCC 4356.

#### 10.4. Curva de calibración de Colesterol

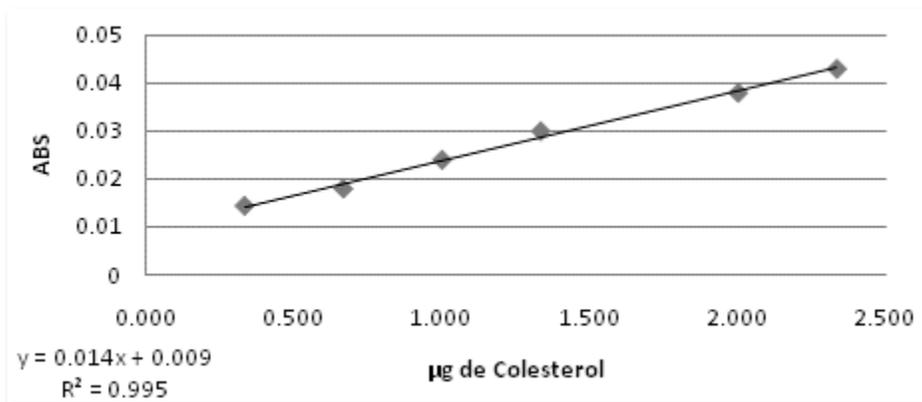


Figura 10. Curva de calibración de Colesterol total

## 10.5. Plantilla de validación estadística

Tabla 11. Validación estadística: Curva de calibración de colesterol

Concentración	Concentración F	Abs	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	X-Y	Ŷ	Y-Ŷ	(Y-Ŷ) <sup>2</sup>	X-X <sub>prom</sub>	(X-X <sub>prom</sub> ) <sup>2</sup>	(Y-Ŷ)/Ŷ
10	0.333	0.0156	0.110889	0.00024336	0.3174	0.063732	-0.048132	0.00231669	0.333	0.110889	-0.755225
10	0.333	0.0132	0.110889	0.00017424	0.3198	0.063732	-0.050532	0.00255348	0.333	0.110889	-0.7928827
10	0.333	0.0156	0.110889	0.00024336	0.3174	0.063732	-0.048132	0.00231669	0.333	0.110889	-0.755225
20	0.667	0.026	0.444889	0.000676	0.641	0.098468	-0.072468	0.00525161	0.667	0.444889	-0.73595483
20	0.667	0.01	0.444889	0.0001	0.657	0.098468	-0.088468	0.00782659	0.667	0.444889	-0.89844416
20	0.667	0.01	0.444889	0.0001	0.657	0.098468	-0.088468	0.00782659	0.667	0.444889	-0.89844416
30	1	0.02	1	0.0004	0.98	0.1331	-0.1131	0.01279161	1	1	-0.84973704
30	1	0.028	1	0.000784	0.972	0.1331	-0.1051	0.01104601	1	1	-0.78963186
30	1	0.02	1	0.0004	0.98	0.1331	-0.1131	0.01279161	1	1	-0.84973704
40	1.33	0.019	1.7689	0.000361	1.311	0.16742	-0.14842	0.0220285	1.33	1.7689	-0.88651296
40	1.33	0.041	1.7689	0.001681	1.289	0.16742	-0.12642	0.01598202	1.33	1.7689	-0.75510692
40	1.33	0.019	1.7689	0.000361	1.311	0.16742	-0.14842	0.0220285	1.33	1.7689	-0.88651296
50	0.041	0.041	0.001681	0.001681	0	0.033364	0.007636	5.8308E-05	0.041	0.001681	0.22886944
50	0.041	0.031	0.001681	0.000961	0.01	0.033364	-0.002364	5.5885E-06	0.041	0.001681	-0.07085481
50	0.041	0.041	0.001681	0.001681	0	0.033364	0.007636	5.8308E-05	0.041	0.001681	0.22886944
60	2.00	0.049	4	0.002401	1.951	0.2371	-0.1881	0.03538161	2	4	-0.79333615
60	2.00	0.027	4	0.000729	1.973	0.2371	-0.2101	0.04414201	2	4	-0.886124
60	2	0.027	4	0.000729	1.973	0.2371	-0.2101	0.04414201	0.89985714	0.80974288	-0.886124
70	2.33	0.038	5.4289	0.001444	2.292	0.27142	-0.23342	0.0544849	1.22985714	1.51254859	-0.85999558
70	2.33	0.048	5.4289	0.002304	2.282	0.27142	-0.22342	0.0499165	1.22985714	1.51254859	-0.82315231
70	2.33	0.038	5.4289	0.001444	2.292	0.27142	-0.23342	0.0544849	1.22985714	1.51254859	-0.85999558
<b>SUMATORIA</b>			38.265777	0.01889796	22.5256	3.363012	-2.785612	0.41759573	9.90128571	33.0089801	-26.5752582
<b>PROMEDIO</b>	1.10014286										
Intervalo de confianza: 1,729 (21 GRADOS DE LIBERTAD)											
Desvest Res	0.141016										
Desvest Pen	0.02454439										
Desvest Int	0.15183										
R	0.99949987										
t intercepto	0.24237634		calculado<teórico: el intercepto es estadísticamente igual a cero								
t Pendiente	251.866061		calculado>teórico: La pendiente es significativamente diferente de cero								
Coef.corre	54.3579684		calculado>teórico: por lo que existe correlación entre Y-X								

## 10.6. Secuencias consenso *gen bsh*

Cepa	Secuencia pb	# pb	% de Homología con la secuencia <i>L. fermentum</i> HM036119.1
<i>L. fermentum</i> K 72	CTCTAAGTACGCCATTTTAGGCGGGATGATCGCCGAGTGGATGATA TACTTAATTGGCGACGGTTTTAACAGGCGGGGCTAGCGGTCCG GAGCTTTACTTTCCCGGCCAGGTTGATTACGCCGCCCGGGCCAA CCGGGGAAAATTAACCTCTCACCCCAGGACGTGATTGGTTACCTAC TGGGCAACTGCGCCAACATTAGCGAGGTGGCGGCCCTGCTACCCC GGTTAGCAATTAACCGGCAGTGGTATGACCACGATATCATCCA CCCTTCCACTGGTTCATCCAGGATGCCAGCGGACCTACCTATTG GAACCAACTAGCCCCACCTGTCTTGCAGCGAGTTGAGTTAGGG GTCTTGACTAATTCACCCACCTACGCCAATCACCTGCGGCGGCTCC GTTCTTTCTGGGCTTGAGTGCCGACGCCCGCTTAAAACGGTGGA GGAAGCGTTAAAGGATTACCAAGGTGATCTGCCGAAGCTCGTCC CCGGTTACCGGTTCAATTGCTACGAGCATCCGGTTAGCGCACCAAC TTCCGGTTGATGATCACCAAGCCGTTGCCATCAATGAAGTTTAT GGGGGCGGTGAAGATGGCGCA	616	99%
<i>L. fermentum</i> K 73	CTCTAAGTACGCCATTTTAGGCATGCGGATGCGCCGAGTGGATGAT TATTACTTAATTGGCGACGGTTTTAACAGGCGGGGCTAGCAGTCG CCGAGCTTTACTTTCCCGGCCAGGTTGATTACGCCGCCCGGGCCC AACCGGGGAAAATTAACCTCTCACCCCAGGACGTGATTGGTTACCT ACTGGGCAACTGCGCCAACATTAGCGAGGTGGCGGCCCTGCTACC CCGGTTAGCAATTACTAACAGCAGTGGTACGACCACGATATCATT CACCCCTTCCACTGGTTCATTACAGGATGCCAGCGGGACCTACCTAT TGAACCAACTAGCCCCACCTGTCTTGCAGCGAGTTGAGTTAGG GGTCTTGACTAATTCACCCGCCTACGCCAATCACCTGCGGCGGCTT CGTTCCTTTCTGGGCTTGAGTGTCGACGCCCGCTTAAAACGGTGG AGGAAGCATTAAAGGATTACCAAGGTGACCTGCCGCAAGCTCGCTC CCCGGTTACCGGTTCAATTGCTACGAGCATCCGGTTAGCGCACCAA CTTCCGGTTGATGATCACCAAGCCGTTGCCGGAAGTCAATGAAAAG GGTTTTGGGGGCGGTGAAGATGGCGCACCTTT	628	99%
<i>L. fermentum</i> S7-2b	GGATGCGCCGAGTGGATGATTATTACTTAATTGGCGACGGTTTTAA CCAGGCGGGGCTAGCGGTGCGCCGAGCTTTACTTTCCCGGCCAGGT TGATTACGCCGCCCGGGCCAAACCGGGGAAAATTAACCTCTCACC CCAGGACGTGATTGGTTACCTACTGGGCAACTGCGCCAACATTAGC GAGGTGGCGGCCCTGCTACCCCGTTAGTAATTAACCGGCAG TGGTATGACCACGATATCATCCACCCCTTCCACTGGTTCATCCAGG ATGCCAGCGGGACCTACCTATTGGAACCAACTAGCCCCACCTGTC CTTGACGCGAGTTGAGTTAGGGGTCTTGACTAATTCACCCACCTAC GCCAATCACCTGCGGCGGCTCCGTTCTTTCTGGGCTTGAGTGCC GACGCCCGCTTAAAATGGTGGAGGAAGCGTTAAAGGATTACCAAG GTGATCTGCCGCAAGCTCGCTCCCGCGTTACGGTTCAATTGCTAC GAGCATCCGGTTAGCGCACCAACTTCCGGTTGATGATCACCAAGCC GTTGCCAGTCAATAGAAGGTTAAGGGGGCGGTGAA	595	99%
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	CTCTAAGTACGCCATTTTAGGCGGGATGCGCCGAGTGGATGATTAT TACTTAATTGGCGACGGTTTTAACAGGCGGGGCTAGCGGTCCG GAGCTTTACTTTCCCGGCCAGGTTGATTACGCCGCCCGGGCCAA CTCGGGGAAAATTAACCTCTCACCCCAGGACGTGATTGGTTACCTA CTGGGCAACTGCGCCAACATTAGCGAGGTGGCGGCCCTGCTACCC CGGTTAGCAATTAACCGGCAGTGGTATGACCACGATATCATCC ACCCCTTCCACTGGTTCATCCAGGATGCCAGCGGGACCTACCTATT GGAACCAACTAGCCCCACCTGTCTTGCAGCGAGTTGAGTTAGG GGTCTTGACTAATTCACCCACCTACGCCAATCACCTGCGGCGGCTC CGTTCCTTTCTGGGCTTGAGTGCCGACGCCCGCTTAAAACGGTG GAGGAAGCGTTAAAGGATTACCAAGGTGATCTGCCGAAGCTCGCT CCCCGCGTTACCGGTTCAATTGCTACGAGCATCCGGTTAGCGCAC GAACTTCCGGTTGATGATCACCAAGCCGTTGCCCTAGTCAATGAAG GTTTTG GGGGCG	620	99%

**10.7. Alineamiento múltiple del gen *bsh* inter e intra- especies del género *Lactobacillus*.**

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	Lf	925	2	Lgbsh	978	51.0
1	Lf	925	3	Lsbsh	978	49.0
1	Lf	925	4	Lrbsh	977	51.0
1	Lf	925	5	Lrhbsh	1016	51.0
1	Lf	925	6	Labsha	978	48.0
1	Lf	925	7	Labshb	977	49.0
1	Lf	925	8	Ljbsh	981	46.0
1	Lf	925	9	Lpbsh4	954	54.0
1	Lf	925	10	Lpbsh2	1017	51.0
1	Lf	925	11	Lpbsh1	975	49.0
1	Lf	925	12	K72	616	98.0
1	Lf	925	13	K73	628	95.0
1	Lf	925	14	S7_2b	584	98.0
1	Lf	925	15	LfATCC	604	98.0
2	Lgbsh	978	3	Lsbsh	978	59.0
2	Lgbsh	978	4	Lrbsh	977	67.0
2	Lgbsh	978	5	Lrhbsh	1016	50.0
2	Lgbsh	978	6	Labsha	978	65.0
2	Lgbsh	978	7	Labshb	977	73.0
2	Lgbsh	978	8	Ljbsh	981	54.0
2	Lgbsh	978	9	Lpbsh4	954	47.0
2	Lgbsh	978	10	Lpbsh2	1017	51.0
2	Lgbsh	978	11	Lpbsh1	975	62.0
2	Lgbsh	978	12	K72	616	55.0
2	Lgbsh	978	13	K73	628	56.0
2	Lgbsh	978	14	S7_2b	584	56.0
2	Lgbsh	978	15	LfATCC	604	56.0
3	Lsbsh	978	4	Lrbsh	977	68.0
3	Lsbsh	978	5	Lrhbsh	1016	52.0
3	Lsbsh	978	6	Labsha	978	65.0
3	Lsbsh	978	7	Labshb	977	63.0
3	Lsbsh	978	8	Ljbsh	981	49.0
3	Lsbsh	978	9	Lpbsh4	954	53.0
3	Lsbsh	978	10	Lpbsh2	1017	51.0
3	Lsbsh	978	11	Lpbsh1	975	60.0
3	Lsbsh	978	12	K72	616	56.0
3	Lsbsh	978	13	K73	628	55.0
3	Lsbsh	978	14	S7_2b	584	57.0
3	Lsbsh	978	15	LfATCC	604	57.0
4	Lrbsh	977	5	Lrhbsh	1016	56.0
4	Lrbsh	977	6	Labsha	978	70.0
4	Lrbsh	977	7	Labshb	977	68.0
4	Lrbsh	977	8	Ljbsh	981	53.0
4	Lrbsh	977	9	Lpbsh4	954	51.0
4	Lrbsh	977	10	Lpbsh2	1017	51.0
4	Lrbsh	977	11	Lpbsh1	975	63.0

4	Lrbsh	977	12	K72	616	56.0
4	Lrbsh	977	13	K73	628	56.0
4	Lrbsh	977	14	S7_2b	584	58.0
4	Lrbsh	977	15	LfATCC	604	57.0
5	Lrhbsh	1016	6	Labsha	978	50.0
5	Lrhbsh	1016	7	Labshb	977	50.0
5	Lrhbsh	1016	8	Ljbsh	981	49.0
5	Lrhbsh	1016	9	Lpbsh4	954	55.0
5	Lrhbsh	1016	10	Lpbsh2	1017	50.0
5	Lrhbsh	1016	11	Lpbsh1	975	51.0
5	Lrhbsh	1016	12	K72	616	63.0
5	Lrhbsh	1016	13	K73	628	64.0
5	Lrhbsh	1016	14	S7_2b	584	63.0
5	Lrhbsh	1016	15	LfATCC	604	62.0
6	Labsha	978	7	Labshb	977	66.0
6	Labsha	978	8	Ljbsh	981	53.0
6	Labsha	978	9	Lpbsh4	954	49.0
6	Labsha	978	10	Lpbsh2	1017	50.0
6	Labsha	978	11	Lpbsh1	975	63.0
6	Labsha	978	12	K72	616	53.0
6	Labsha	978	13	K73	628	53.0
6	Labsha	978	14	S7_2b	584	55.0
6	Labsha	978	15	LfATCC	604	53.0
7	Labshb	977	8	Ljbsh	981	54.0
7	Labshb	977	9	Lpbsh4	954	46.0
7	Labshb	977	10	Lpbsh2	1017	47.0
7	Labshb	977	11	Lpbsh1	975	62.0
7	Labshb	977	12	K72	616	54.0
7	Labshb	977	13	K73	628	53.0
7	Labshb	977	14	S7_2b	584	56.0
7	Labshb	977	15	LfATCC	604	53.0
8	Ljbsh	981	9	Lpbsh4	954	48.0
8	Ljbsh	981	10	Lpbsh2	1017	53.0
8	Ljbsh	981	11	Lpbsh1	975	53.0
8	Ljbsh	981	12	K72	616	57.0
8	Ljbsh	981	13	K73	628	59.0
8	Ljbsh	981	14	S7_2b	584	59.0
8	Ljbsh	981	15	LfATCC	604	59.0
9	Lpbsh4	954	10	Lpbsh2	1017	48.0
9	Lpbsh4	954	11	Lpbsh1	975	50.0
9	Lpbsh4	954	12	K72	616	62.0
9	Lpbsh4	954	13	K73	628	63.0
9	Lpbsh4	954	14	S7_2b	584	63.0
9	Lpbsh4	954	15	LfATCC	604	62.0
10	Lpbsh2	1017	11	Lpbsh1	975	50.0
10	Lpbsh2	1017	12	K72	616	60.0
10	Lpbsh2	1017	13	K73	628	59.0
10	Lpbsh2	1017	14	S7_2b	584	60.0
10	Lpbsh2	1017	15	LfATCC	604	60.0
11	Lpbsh1	975	12	K72	616	57.0
11	Lpbsh1	975	13	K73	628	57.0
11	Lpbsh1	975	14	S7_2b	584	57.0

11	Lpbsh1	975	15	LfATCC	604	56.0
12	K72	616	13	K73	628	97.0
12	K72	616	14	S7_2b	584	98.0
12	K72	616	15	LfATCC	604	99.0
13	K73	628	14	S7_2b	584	97.0
13	K73	628	15	LfATCC	604	97.0
14	S7_2b	584	15	LfATCC	604	98.0

La tabla muestra el porcentaje de identidad entre los genes bsh del género Lactobacillus. Lp1=*L. plantarum* gen bsh 1, Lp2=*L. plantarum* gen bsh 2, Lp4=*L. plantarum* gen bsh 4, Lj=*L. johnsonii* gen bsh, Laa=*L. acidophilus* gen bsh a, Lab=*L. acidophilus* gen bsh a, Lrh=*L. rhamnosus* gen bsh, Lr=*L. reuteri* gen bsh, Ls=*L. salivarius* gen bsh, Lg=*L. gasseri* gen bsh, Lf=*L. fermentum* gen bsh

## 10.8. Comparación de medias de Tukey (SPSS 15.0)

### 10.8.1. Cepa *L. fermentum* K72

#### TCA

HSD de Tukey ab

hora	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
6.00	2	.5519		
2.00	3		.5829	
4.00	3		.5874	
.00	3			.6341
Sig.		1.000	.907	1.000

#### GCA

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
4.00	3	.0464
2.00	3	.0469
6.00	3	.0475
.00	3	.0498
Sig.		.387

### TDCA

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
6.00	2	.6193		
4.00	3		.6612	
2.00	3		.6682	
.00	3			.7149
Sig.		1.000	.620	1.000

### 10.8.2. Cepa *L. fermentum* K73

#### TCA

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
6.00	2	.5751		
4.00	3	.5754		
.00	3		.6335	
2.00	3			.7150
Sig.		1.000	1.000	1.000

#### GCA

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
6.00	3	.0283		
4.00	3		.0461	
.00	3		.0499	.0499
2.00	3			.0547
Sig.		1.000	.347	.197

**TDCA**

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
6.00	2	.6432	
4.00	3	.6586	
.00	3		.7412
2.00	3		.8191
Sig.		.918	.058

**10.8.3. Cepa *L. fermentum* S7-2b**

**TCA**

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
6.00	2	.5728
2.00	2	.5852
4.00	3	.5896
.00	3	.6047
Sig.		.078

**GCA**

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
2.00	2	.0442
.00	3	.0460
4.00	3	.0490
6.00	2	.0494
Sig.		.340

**TDCA**

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
6.00	2	.6328	
4.00	3	.6619	.6619
2.00	2		.6705
.00	3		.6921
Sig.		.120	.107

**10.8.4. Cepa *L. fermentum* ATCC 9338**

**GCA**

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
2.00	3	.0444
.00	3	.0460
4.00	3	.0475
6.00	3	.0496
Sig.		.118

**TDCA**

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
4.00	3	.6658
2.00	3	.6743
6.00	3	.6774
.00	3	.6820
Sig.		.855

**TCA**

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
2.00	3	.5894
4.00	3	.5901
.00	3	.5937

6.00	3	.6032
Sig.		.760

### 10.8.5. Cepa *L. acidophilus* ATCC 4356

#### TCA

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
4.00	3	.5897
6.00	3	.5917
.00	3	.5990
2.00	3	.6107
Sig.		.396

#### GCA

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
4.00	3	.0451
2.00	3	.0464
.00	3	.0476
6.00	3	.0487
Sig.		.274

#### TDCA

HSD de Tukey

hora	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
4.00	3	.6668
6.00	3	.6675
.00	3	.6758
2.00	3	.7078
Sig.		.108