



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA
Y MATERIALES

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE LACTOBACILLUS AISLADOS
A PARTIR DE MASA MADRE, SOBRE PÉPTIDOS RICOS EN PROLINA DERIVADOS
DE GLIADINA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
MENCIÓN QUÍMICA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

JUAN PABLO BIRON LATTES

PROFESOR GUÍA:
ALVARO OLIVERA NAPPA

PROFESORA COGUIA:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BARBARA ANDREWS FARROWS
IRENE MARTINEZ BASTERRECHEA

SANTIAGO DE CHILE
2020

**RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR
AL TÍTULO DE:**

Ingeniero Civil en Biotecnología y grado de
Magister en ciencias de la Ingeniería
mención Química

POR: Juan Pablo Biron Lattes

FECHA: Agosto 2020

PROFESOR GUÍA: Álvaro Olivera Nappa

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE *LACTOBACILLUS*,
AISLADOS DE MASA MADRE, SOBRE PÉPTIDOS DERIVADOS DE GLIADINA**

La enfermedad celiaca afecta alrededor del 2% de la población mundial y el único tratamiento a la fecha consiste en llevar una dieta estricta de alimentos que no contengan gluten. Encontrar alternativas para producir alimentos aptos para celíacos sin incurrir en altos costos de materias primas y sin afectar negativamente sus características nutricionales y organolépticas, es una tarea de gran interés para la industria alimenticia.

En este trabajo se evaluó la capacidad proteolítica de bacterias ácido lácticas, aisladas de masa madre, sobre los péptidos del gluten asociados a la respuesta inmune en celíacos. Los microorganismos se seleccionaron según su capacidad de utilizar péptidos derivados de gliadina -la proteína del gluten que contiene los péptidos inmunogénicos- como única fuente de nitrógeno. De 30 colonias de bacterias ácido lácticas aisladas de masa madre, solo 9 se desarrollaron en medios con péptidos derivados de gliadina. Las características proteolíticas de las 9 colonias aisladas indican que corresponderían a variedades *starters*, es decir, que expresan proteinasas asociadas a la envoltura celular. La colonia #1 se utilizó en un ensayo de digestión de gliadina, produciendo una digestión casi completa de dicho sustrato, mientras que las 8 colonias restantes no alcanzaron a ser evaluadas.

Un análisis teórico de digestión de alfa gliadina por las proteasas de variedades *starters* de bacterias ácido lácticas, sustenta la eficacia de estas bacterias en la digestión de los epítomos del gluten. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis que bacterias ácido lácticas, presentes naturalmente en la masa madre, constituyen una herramienta eficaz para la producción de alimentos aptos para celíacos, elaborados a partir de materias primas que contienen gluten.

Agradecimientos

A mi familia, porque siempre han estado ahí y siempre lo estarán. En particular a mis padres, que sin su apoyo y sacrificio nunca habría alcanzado las metas que me he propuesto. Han estado ahí en cada momento, en las buenas y en las malas, en las dudas y en las certezas. Cada parte de mi existe directa o indirectamente gracias a ustedes. Gracias infinitas por todo el tiempo, cariño, valores y enseñanzas. Los amo.

A los K, que hicieron de mi paso por el CeBiB una experiencia tan enriquecedora y disfrutable que me voy con el corazón contento, lleno de energía y aprendizajes. Muchísimas gracias a todos por su disposición incondicional a ayudar y guiarme cuando andaba perdido. En especial a la Anita que, sin ella, esta tesis sería un informe de 5to básico y al Men, que siempre estuvo atento en que mi trabajo en el laboratorio fuese riguroso. Siempre sacrificó su tiempo para enseñarme nuevas técnicas y protocolos. Qué acierto haberme encontrado con ustedes, los quiero mucho.

Al grupo PESB2, que finalmente logramos unificar y construir un equipo de trabajo muy comprometidos el uno con el otro, complementándonos y retroalimentándonos. Espero que sigan haciendo lo mismo porque aparte de ser un grupo de trabajo, es un espacio de contención importante, o al menos así lo fue para mí. Un agradecimiento especial a Juan Amado, que, aparte de siempre estar dispuesto a escuchar mis dudas, trabajó incondicionalmente para facilitarme el clon que usaría más adelante en la tesis.

A mi profesor guía, Álvaro Olivera, quien confió en mí cuando le propuse mi tema de tesis, que nada tenía que ver con sus líneas de investigación. Álvaro es una aguja en un pajar. Si bien, su calidad en el ámbito profesional es admirable, más aún, su calidad como ser humano lo convierte en un referente para mí. Gracias por haberme dado la oportunidad de desarrollar un tema que conecta mi lado profesional con mis intereses y hobbies.

A la profesora Oriana, que, aunque todavía dudo si se aprendió mi nombre, siempre estuvo para responder mis dudas, cuyas respuestas nunca estuvieron exentas de su humor característico (¿o sí?). Agradezco su disposición a ayudarme en las tareas de laboratorio, que, sin duda, evitaron poner en peligro a mis compañeros.

A los litol chisen, que hicieron de mi etapa final en el departamento, una de las fases más enriquecedoras. Cuántas anécdotas que me llevo por compartir con ustedes. Cuántos viernes llenos de locura. Cuánta música y corriente de la consciencia que nos transformaba en demonios simpaticones. Cuántas carneras, cuántos kazos, cuántos buenos momentos. Gracias por tanto y perdón por tan poco.

A los tofus, que, a pesar de las ausencias, siempre me tuvieron presente. Agradezco cada buen momento que he vivido con ustedes, cada paseo, cada carrete mechón y esquinazo. Cada uno ocupa un lugar en mi corazón y les deseo lo mejor en esta nueva etapa que están viviendo.

Finalmente quiero agradecer a todas esas personas que en alguna etapa de mi carrera estuvieron ahí. A esos grupos que se arman y que, por determinadas circunstancias, se terminan diluyendo. No obstante, los recuerdo con mucho cariño y aprovecho de agradecerles por la marca que dejaron en mí. Cada uno de ustedes afectó de alguna manera mi forma de ver las cosas y por lo tanto mis decisiones. Un abrazo apretadísimo a cada uno de ustedes.

Tabla de contenido

1	Motivación.....	1
2	Antecedentes	2
2.1	Enfermedad Celiaca.....	2
2.1.1	Antígeno leucocitario humano (HLA).....	2
2.1.2	Transglutaminasa Tisular (tTG).....	2
2.2	Gluten.....	4
2.2.1	Clasificación de las proteínas del gluten.....	4
2.2.2	Toxicidad del gluten	8
2.3	Masa madre.....	9
2.4	Bacterias ácido lácticas	13
2.4.1	Sistema proteolítico de las BAL	13
2.4.2	Especificidad de las proteinasas asociadas a la envoltura celular	17
3	Objetivos	20
3.1	Objetivo general.....	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	Materiales y Metodología	21
4.1	Medios de cultivo	21
4.2	Obtención de gliadina	21
4.3	Obtención del péptido de alimentación	21
4.4	Microorganismos y condiciones de cultivo	22
4.5	Selección de microorganismos según su capacidad de utilizar PPG como fuente de nitrógeno	22
4.5.1	Por evolución artificial en cultivo continuo	22
4.5.2	Por placas en medios semi sólidos	23
4.6	Cultivo y fraccionamiento Celular	24
4.7	Ensayos de digestión.....	24
4.8	Producción recombinante del péptido inmunogénico 33-mer	25
4.9	Soluciones	25
5	Resultados y discusiones.....	27
5.1	Obtención del péptido de alimentación (PPG).....	27
5.2	Obtención del consorcio de lactobacilos de la masa madre	28
5.3	Selección de lactobacilos según capacidad de alimentarse de péptidos de gliadina	28
5.4	Capacidad proteolítica de lactobacillus seleccionados con gliadina	30

5.5	Producción recombinante de péptido inmunogénico 33-mer.	34
5.6	Hidrólisis teórica de alfa gliadina.....	37
6	Conclusiones.....	39
7	Bibliografía.....	40
8	Anexos.....	48
8.1	Anexo 1: Secuencia aminoacídica de la gliadina	48
8.1.1	Alfa gliadina (290 aa - 33.7 kDa) [101].....	48
8.1.2	Gamma gliadina (251 aa - 29 kDa) [102].....	48
8.1.3	Omega gliadina (354 aa - 38.4 kDa) [103]	48
8.1.4	Alfa-beta gliadina (307 aa - 35.3 kDa) [104].....	48
8.2	Anexo 2: Determinación de concentración de gliadina en solución alcohólica al 70% en ensayo de Bradford.....	49
8.3	Anexo 3: Medios de cultivo	50
8.3.1	Medio definido químicamente (CDM).....	50
8.3.2	Medio De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)	52
8.3.3	Terrific Broth (TB)	52
8.4	Anexo 4: Constructos.....	53
8.4.1	Secuencia nucleotídica del constructo “33-mer fusión”.....	53
8.5	Anexo 5: Cálculo del flujo máximo de medio para cultivo continuo.	55

Índice de tablas

Tabla 1: Caracterización de las fracciones proteicas presentes en el gluten [24].	6
Tabla 2: Bacterias ácido lácticas generalmente encontradas en masas madres. Adaptado de [43].	12
Tabla 3: Peptidasas intracelulares caracterizadas de las bacterias ácido lácticas [57]. .	15
Tabla 4: Volúmenes de reacción en microlitros (ul) de cada especie para construir las reacciones enzimáticas y los controles de la digestión. El volumen total de las reacciones equivale a 360 ul.	Error! Bookmark not defined.
Tabla 5: Péptidos resultantes de la digestión teórica de alfa gliadina con una subtilasa genérica, a modo de simular la acción de los CEP sobre el sustrato.	38
Tabla 6: Composición del medio definido modificado.	50
Tabla 7: Composición del medio MRS modificado.	52
Tabla 8: Composición de medio TB.	53

Índice de figuras

Figura 1: Efecto de la transglutaminasa tisular en un residuo de glutamina ante la presencia de grupos épsilon-amino, aminas primarias o agua. Adaptado de [16].	3
Figura 2: SDS-PAGE de gliadinas extraídas de diferentes variedades de trigo. Se señalan los distintos tipos de gliadinas en el gel [27].	5
Figura 3: Estructuras esquemáticas de las gliadinas α y γ que interactúan con las subunidades de alto y bajo peso molecular de las gluteninas. Las letras c señalan la posición de las cisteínas y sus índices superiores fueron propuestos por Kohler et al. [27][25]. Se indican las secciones I-V para la familia LMW y las A-C para las HMW.	7
Figura 4: Diagrama de la respuesta inmune ante la ingesta de gluten en pacientes celíacos	9
Figura 5: Ruta metabólica homofermentativa en la producción de ácido láctico. Adaptada de [37].	10
Figura 6: Ruta metabólica heterofermentativa ilustrando la producción de lactato, CO ₂ y acetato o etanol. Adaptada del [37].	11
Figura 7: Representación de los CEP's de distintas bacterias ácido lácticas. Con citoplasma C, membrana celular MC, pared celular PC y prepro-dominio PP, dominio catalítico PR, dominio de inserción I, dominio A, dominio B, dominio helicoidal H, dominio espaciador W y dominio de anclaje AN. Adaptado de Siezen et. al [64].	14
Figura 8: Resumen esquemático de la función y regulación del sistema proteolítico de <i>Lactococcus Lactis</i> en la digestión de caseína. A. Una proteinasa de envoltura celular PrtP, permeasa de oligopéptido Opp, transportador iónico para di y tri péptidos DtpT y el transportador dependiente de ATP Dpp para péptidos entre 2 y 4 residuos. B. Peptidasas intracelulares. PepO y PepF son enopeptidasas, PepN/PepC/PepP son aminopeptidasas generales, PepX una X-prolil dipeptidil aminopeptidasa, PepT una tripeptidasa, PepQ una prolidasa, PepR una prolinasa, PepI un prolin iminopeptidasa y PepD y PepV dipeptidasas. C. El represor transcripcional CodY, censa la presencia de aminoácidos ramificados (BCAA's). Usando estos aminoácidos como cofactores, reprime la expresión de genes que constituye el sistema proteolítico de <i>Lactococcus Lactis</i> . Imagen adaptada de Kirsi et. al [57].	16
Figura 9: Representación esquemática de la unión del sustrato / inhibidor (líneas en negrita) a una serin proteasa de tipo subtilisina (superficies lisas). Nomenclatura P4-P2' y S4-S2' según Schechter y Berger (1967) [86]. Las cadenas laterales de los residuos P4-P2 'se muestran como esferas grandes; Las posiciones de los residuos enzimáticos que pueden interactuar con estas cadenas laterales P4-P2 'se muestran alrededor de los sitios de unión (S1, S2, etc.). La numeración de los residuos corresponde específicamente a la de la subtilisina BPN'. Los enlaces de hidrógeno entre la enzima y el inhibidor del sustrato se muestran como líneas punteadas, y el enlace peptídico del sustrato, que se escindirán, se muestra mediante una línea dentada. Se indican los residuos catalíticos D32, H64 y S221, y el residuo de agujero de oxianión N 155. Imagen adaptada de [82]	18
Figura 10: Esquema de funcionamiento del fermentador continuo.	23

Figura 11: SDS-PAGE de la reacción enzimática del medio extracelular, intracelular y debrís celular con gliadina como sustrato. El tiempo total de reacción fue de 4 horas a 30°C. La banda prominente bajo los 20 kDa corresponde a la lisozima utilizada para romper las células. Imagen obtenida por el escaneo del gel en fotodocumentador.30

Figura 12: SDS-PAGE de la reacción enzimática de las distintas fracciones celulares con gliadina como sustrato. La banda presente en las fracciones celulares ubicada bajo los 20 kDa es la lisozima utilizada para romper las células. Imagen obtenida por el escaneo del gel en fotodocumentador.33

Figura 13: SDS-PAGE de las muestras obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad Ni-NTA del péptido recombinante. El péptido purificado se encuentra entre los carriles A9 y B1. P.I corresponde a la proteína insoluble del cultivo. Imagen obtenida por el escaneo del gel en fotodocumentador.....35

Figura 14: Mapa del constructo 33-mer fusión en el plasmidio pBluescript SK II (+).54

Figura 15: Mapa del constructo 33-mer fusión en el plasmidio pET28a (+)55

1 Motivación

La enfermedad celiaca es una enfermedad autoinmune provocada por la ingesta de fracciones proteicas que constituyen el gluten. Esta patología se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades intestinales a causa de una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T CD4⁺. A medida que el tejido se degrada, la absorción de nutrientes disminuye, causando graves problemas al paciente. Los síntomas clásicos en infantes incluyen diarrea crónica, distensión abdominal y retraso en el desarrollo, mientras que los pacientes diagnosticados más tarde muestran anemia, fatiga, pérdida de peso, diarrea y síntomas neurológicos [1]. Cerca del 2% de la población la padece [2], aunque se estima que un número importante de individuos permanece sin diagnosticar [3].

El único tratamiento a la fecha es seguir estrictamente una dieta libre de gluten, sin embargo, se estima que el 30% de los pacientes no la sigue de manera constante. Pobre palatabilidad, alto costo y poca oferta de productos sin gluten son algunos de los factores que dificultan dicho tratamiento [4].

El diagnóstico de esta enfermedad requiere una biopsia duodenal que muestre los hallazgos característicos de una linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas, atrofia vellosa y una respuesta positiva ante una dieta sin gluten [5]. Aunque ningún estudio ha examinado el número de biopsias requeridas para el diagnóstico, se piensa que se deben obtener al menos cuatro a seis muestras de biopsias endoscópicas del duodeno, dada la naturaleza irregular de la enfermedad [6].

El gluten es digerido por las enzimas digestivas y en este proceso se liberan péptidos ricos en prolina y glutamina que son capaces de atravesar la primera capa de células del intestino y llegar a la lámina propia; una fina capa de tejido conjuntivo que se encuentra situada por debajo del epitelio y forma junto a este la mucosa. Aquí ocurre la desamidación de dichos péptidos por acción de la transglutaminasa tisular, una enzima que se encuentra en varios órganos del cuerpo y es capaz de reconocer y desamidar estos epítomos [7]. Una vez modificados, son capturados por las proteínas de membrana del complejo leucocitario humano HLA-DQ2 (o HLA-DQ8) de las células presentadoras de antígeno de pacientes celíacos. Dichos epítomos, se presentan a las células T CD4⁺ reactivas a los péptidos desamidados a través de un receptor de células T, lo que resulta en la producción de citoquinas que causan daño tisular. Esto conduce a la atrofia de las vellosidades y la hiperplasia de las criptas, así como a la activación y expansión de las células B que producen anticuerpos [8].

Hasta la fecha, se han identificado al menos 17 epítomos a partir de proteínas de gluten que se encuentran en los granos. Curiosamente, la mayoría de estos epítomos tienen que someterse a una desamidación, mediada por la transglutaminasa, de ciertos residuos de glutamina a glutamato para provocar una respuesta de las células T [9].

2 Antecedentes

2.1 Enfermedad Celiaca

La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad inmunomediada que se desencadena por la ingestión de gliadina y de otras prolaminas tóxicas en individuos genéticamente susceptibles [10]. Se caracteriza por una respuesta inmune desregulada a nivel intestinal dominada por células T. Esta respuesta inmune anormal de la mucosa da como resultado la enteropatía. La EC puede considerarse una enfermedad autoinmune debido a la presencia de autoanticuerpos tanto en el suero como en la mucosa intestinal de los pacientes.

2.1.1 Antígeno leucocitario humano (HLA)

El sistema o complejo del antígeno leucocitario humano (HLA) es un complejo genético que codifica las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en los seres humanos. Estas proteínas de la superficie celular son responsables de la regulación del sistema inmunológico en los seres humanos. El complejo del gen HLA consta de más de 200 genes ubicados en el cromosoma 6, los que se clasifican en tres grupos básicos: clase I, clase II y clase III [11].

Los genes HLA clase I (A, B y C) presentan péptidos desde el interior de la célula. Por ejemplo, si la célula está infectada por un virus, el sistema HLA lleva fragmentos del virus a la superficie de la célula para que el sistema inmunitario pueda destruirla. Estos péptidos se producen a partir de proteínas digeridas que se descomponen en los proteosomas. Los antígenos extraños presentados por el MHC de clase I atraen a las células T citotóxicas (también llamadas células T CD8⁺) que destruyen las células. Si el sistema inmunitario reconoce los péptidos como extraños (como los péptidos víricos o bacterianos), responde provocando que la célula infectada se autodestruya [12].

Los genes HLA de clase II (DP, DM, DO, DQ y DR) presentan antígenos del exterior de la célula a los linfocitos T. Estos antígenos particulares estimulan la multiplicación de las células T *helper* (también llamadas células T CD4⁺), que a su vez estimulan las células B productoras de anticuerpos para producirlos contra ese antígeno específico [13].

Las proteínas producidas a partir de los genes MHC de clase III tienen funciones algo diferentes; están involucrados en la inflamación y otras actividades del sistema inmunológico. Las moléculas de clase III incluyen varias proteínas secretadas con funciones inmunes: componentes del sistema del complemento (como C2, C4 y factor B), citoquinas (como TNF- α , LTA y LTB) y proteínas de shock térmico [11].

2.1.2 Transglutaminasa Tisular

La transglutaminasa tisular (tTG), un miembro de la familia de enzimas transglutaminasa, es una proteína multifuncional expresada de forma ubicua y se caracteriza por catabolizar una amplia variedad de sustratos [14]. Cataliza principalmente la formación de un enlace isopeptídico entre los grupos γ -carboxamida de las cadenas laterales de residuos de glutamina y los grupos ϵ -amino de las cadenas laterales de residuos de lisina. Los residuos de glutamina se pueden desamidar a ácido glutámico como reacción secundaria en ausencia de aminas adecuadas o a pH bajo. Además, tTG es capaz de ligar e

hidrolizar GTP, de modo que la enzima puede funcionar como un transductor de señal celular [15].

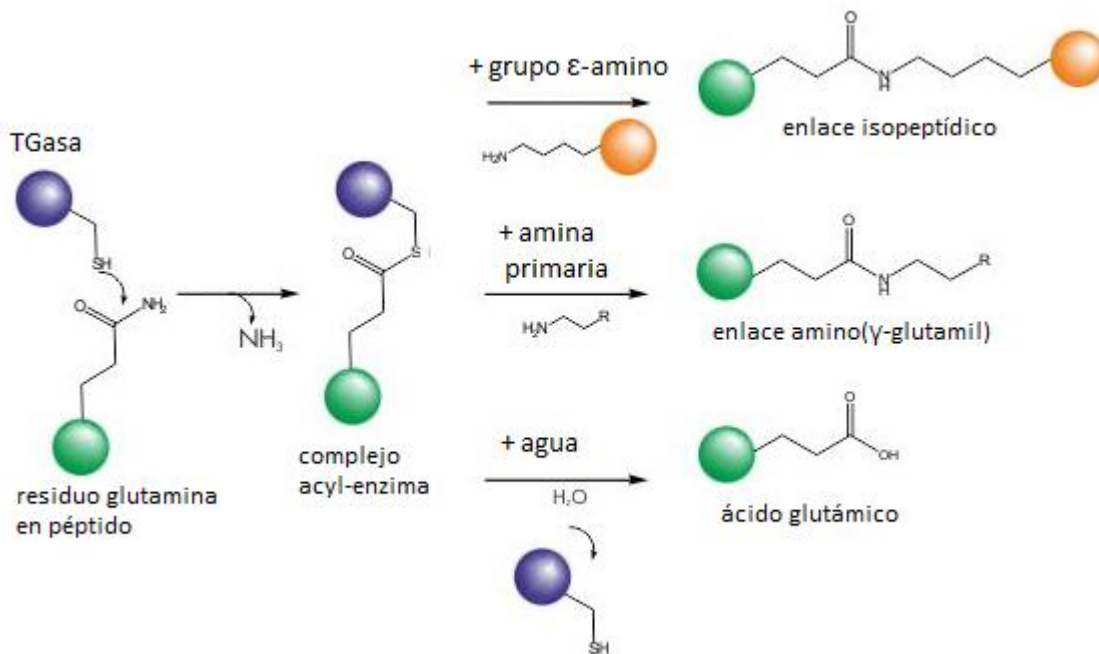


Figura 1: Efecto de la transglutaminasa tisular en un residuo de glutamina ante la presencia de grupos ϵ -amino, aminas primarias o agua. Adaptado de [16].

tTG puede encontrarse en el citoplasma celular, núcleo, membrana celular y en la matriz extracelular lo que indica una gran variedad de posibles actividades biológicas en el organismo [16], [18]. Una de las funciones que cumple esta enzima es la de organizar proteínas del citoesqueleto (como beta-tubulina, actina, miosina y vimentina) en la apoptosis celular. Esta polimerización, que ocurre al final de proceso apoptótico, estabiliza la célula previniendo la liberación de componentes celulares que puedan causar respuestas inflamatorias o autoinmunes. También cumple funciones de modulación en la adhesión de la matriz celular, señalización por medio de integrinas, migración celular, proliferación y diferenciación [18]. También, la tTG se ha visto asociada en una variedad de enfermedades, como algunos tipos de fibrosis, enfermedades neurodegenerativas, inflamaciones, dermatitis herpetiforme, crecimiento de tumores y enfermedades autoinmunes como la enfermedad celiaca [20], [21].

La tTG no posee especificidad por ningún péptido en específico y reconoce a una gran variedad de ellos como sustratos, dentro de los cuales se encuentran secuencias peptídicas presentes en el gluten. Existen dos maneras en que la tTG participa en la EC; la primera es la desamidación de dichos péptidos en donde pasan de una forma no inmunogénica a antígenos que estimulan eficientemente células T, desembocando una liberación masiva de citoquinas a nivel de las paredes del intestino delgado, causando daño tisular [7], [10]. La segunda, corresponde a la formación del complejo tTG-gliadina,

el cual contiene epítomos que estimulan la producción de anticuerpos anti tTG-gliadina por parte de las células T [21].

2.2 Gluten

El gluten es una proteína de almacenamiento que se encuentra en cereales como el trigo, la cebada, la avena y el centeno. Se ubica principalmente en el endospermo de los granos, junto con el almidón y otorga propiedades viscoelásticas que permiten la retención de agua y gases provenientes de una fermentación u otra reacción química. Así, se pueden obtener migas suaves, alveoladas, panes de mayor volumen y con mayor vida útil que uno elaborado con harinas sin gluten. En particular, la harina de trigo se clasifica según su contenido de proteínas, que en su mayoría corresponde al gluten. Un alto porcentaje de gluten significa una harina más fuerte, es decir, más adecuada para la elaboración de panes de alto volumen. Menos proteína significa una harina más “floja” y se relaciona con una miga frágil, mejor para productos que no requiera tanto volumen como galletas, queques, masa de *pies* o tartas. El porcentaje de proteínas en la harina oscila entre un 8 y un 15% [22].

En estricto rigor, el gluten es el resultado de la interacción de dos familias de proteínas pertenecientes al endospermo; las gliadinas y las gluteninas. En medio acuoso, estas proteínas tienden a interactuar entre sí, formando una matriz proteica, conocida como gluten, que otorga elasticidad y viscosidad a la masa [23].

2.2.1 Clasificación de las proteínas del gluten

El gluten se conforma por dos familias de proteínas; las gliadinas y las gluteninas. Estas se caracterizan por tener un alto porcentaje de prolínas y glutaminas y se las suelen denominar prolaminas. Se clasifican según su solubilidad en soluciones alcohólicas (60-75%), donde las gliadinas corresponden a las fracciones solubles y las gluteninas a las insolubles. Además, estas fracciones otorgan propiedades reológicas diferentes a la masa; mientras las gliadinas aportan plasticidad y extensibilidad, las gluteninas confieren elasticidad y viscosidad [22]. A pesar de la baja cantidad de cisteínas presentes en el gluten (~2%), son extremadamente importantes para sus propiedades mecánicas. La mayoría de las cisteínas están presentes en un estado oxidado y forman enlaces disulfuro inter y/o intra-cadena. Sin embargo, se ha determinado que enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, iónicos e hidrófobos adicionales también juegan un rol en la reología del gluten [24].

2.2.1.1 Gliadinas

Las gliadinas comprenden una familia de proteínas principalmente monoméricas cuyos pesos moleculares varían entre 28-55 kDa [24] y se clasifican según su movilidad en electroforesis. En orden creciente de movilidad se tienen las ω -gliadinas, γ -gliadinas, β -gliadinas y α -gliadinas, aunque dada la similitud entre α - y β -gliadinas, se tiende a agruparlas solo como α -gliadinas. Las secuencias y características de cada tipo de gliadinas se detallan en el Anexo 1.

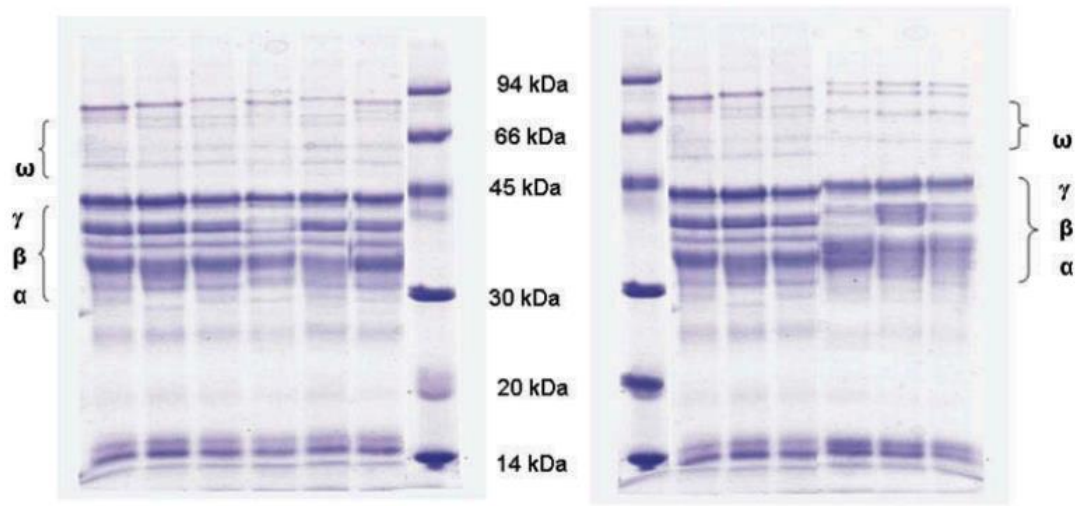


Figura 2: SDS-PAGE de gliadinas extraídas de diferentes variedades de trigo. Se señalan los distintos tipos de gliadinas en el gel [27].

Las ω -gliadinas se caracterizan por tener los contenidos más altos de glutamina, prolina y fenilalanina entre las demás fracciones del gluten y consisten, casi en su totalidad, en secuencias repetitivas como PQQPFPQQ, ubicándose entre los 40 y 50 kDa. Estas fracciones son ricas en vueltas β (disposición antiparalela de láminas β) y parecen no tener estructuras de hoja β o hélices α [25]. A diferencia de las α - y γ -gliadinas, las ω -gliadinas carecen de cisteína, por lo que no hay posibilidad de establecer enlaces disulfuro intra o inter-cadenas [23].

Las α - y β -gliadinas se ubican entre los 28 y 35 kDa, respectivamente y contienen una menor proporción de glutamina y prolina que las ω -gliadinas. Se reconocen unidades repetitivas de dodecapéptidos, como QPQPFPQQPPP, que generalmente se repiten cinco veces y se modifican mediante la sustitución de residuos individuales. Para el caso de las γ -gliadinas, su unidad repetitiva es QPQQPFP, que se repite hasta 16 veces y se intercala con residuos adicionales [24].

El dominio N-terminal de los distintos tipos de gliadina, consiste principalmente en secuencias repetitivas ricas en glutamina, prolina, fenilalanina y tirosina y es único para cada tipo (secciones I y II, Figura 3). Dentro de los dominios C-terminales, las gliadinas α y γ son homólogas (secciones III-V, Figura 3) y constituyen secuencias no repetitivas. Tienen menos glutamina y prolina que el dominio N-terminal, y es donde están presentes residuos cargados e hidrofóbicos y la mayoría de las cisteínas [26]. En general, las α -gliadinas contienen seis cisteínas y las γ -gliadinas ocho, ubicadas en el dominio C-terminal; formando tres y cuatro enlaces intra cadenas, respectivamente [26] (Figura 3).

En relación a la estructura secundaria, los dominios N-terminales de las gliadinas α y γ se caracterizan por una conformación de vueltas β , similar a las ω -gliadinas [25], en

cambio, el dominio C-terminal contiene proporciones considerables de estructuras hélice- α y hoja- β .

2.2.1.2 Gluteninas

Las gluteninas son polímeros proteicos estabilizados por enlaces disulfuro entre sus cadenas. La separación de gluteninas por SDS-PAGE muestra dos subgrupos; las gluteninas de alto peso molecular (HMW) y la de bajo peso molecular (LMW). Ambas establecen enlaces entre α - y γ -gliadinas en mayor proporción que con las ω -gliadinas [22]. En su estado nativo se componen de un esqueleto compuesto por las fracciones de alto peso molecular, en cuyas ramificaciones se ubican las de bajo peso molecular. Se ha identificado que el principal agente determinante de las propiedades viscoelásticas de la masa son las gluteninas de alto peso molecular, por sobre las gliadinas y las gluteninas de bajo peso molecular [27]. Cuando los enlaces disulfuro se reducen, las gluteninas adquieren la misma solubilidad que las gliadinas en soluciones alcohólicas [24].

Al igual que las fracciones de la gliadina, las gluteninas de bajo peso molecular (LMW) contienen dos dominios diferentes: el dominio N-terminal (sección I, Figura 3) que consiste en unidades repetitivas ricas en glutamina y prolina, como QQQPPFS, mientras que el dominio C-terminal (secciones III – V, Figura 3) es homólogo al de α - y γ -gliadinas dentro de las secciones III y V. Las gluteninas de bajo peso molecular contienen nueve cisteínas [26]; 6 residuos están en posiciones homólogas a las gliadinas α y γ , por lo que se presume que están unidos por enlaces disulfuro (Figura 3). Tres cisteínas adicionales se encuentran en las secciones I y IV y no son capaces de formar un enlace intra-cadenas, en consecuencia, se generan enlaces disulfuro inter-cadenas con cisteínas de diferentes proteínas de gluten.

Tabla 1: Caracterización de las fracciones proteicas presentes en el gluten [24].

Tipo	P. Molecular kDa	Proporción (%)*	Composición aminoacídica parcial (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω -gliadinas	40-55	3-7	56	24	9	1	1
α/β -gliadinas	28-35	28-33	37	16	4	3	2
γ -gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1	3
Glutenina HMW	83-88	4-9	37	13	0	6	19
Glutenina LMW	32-39	19-25	38	13	4	1	3

*: En relación al total de las proteínas del gluten

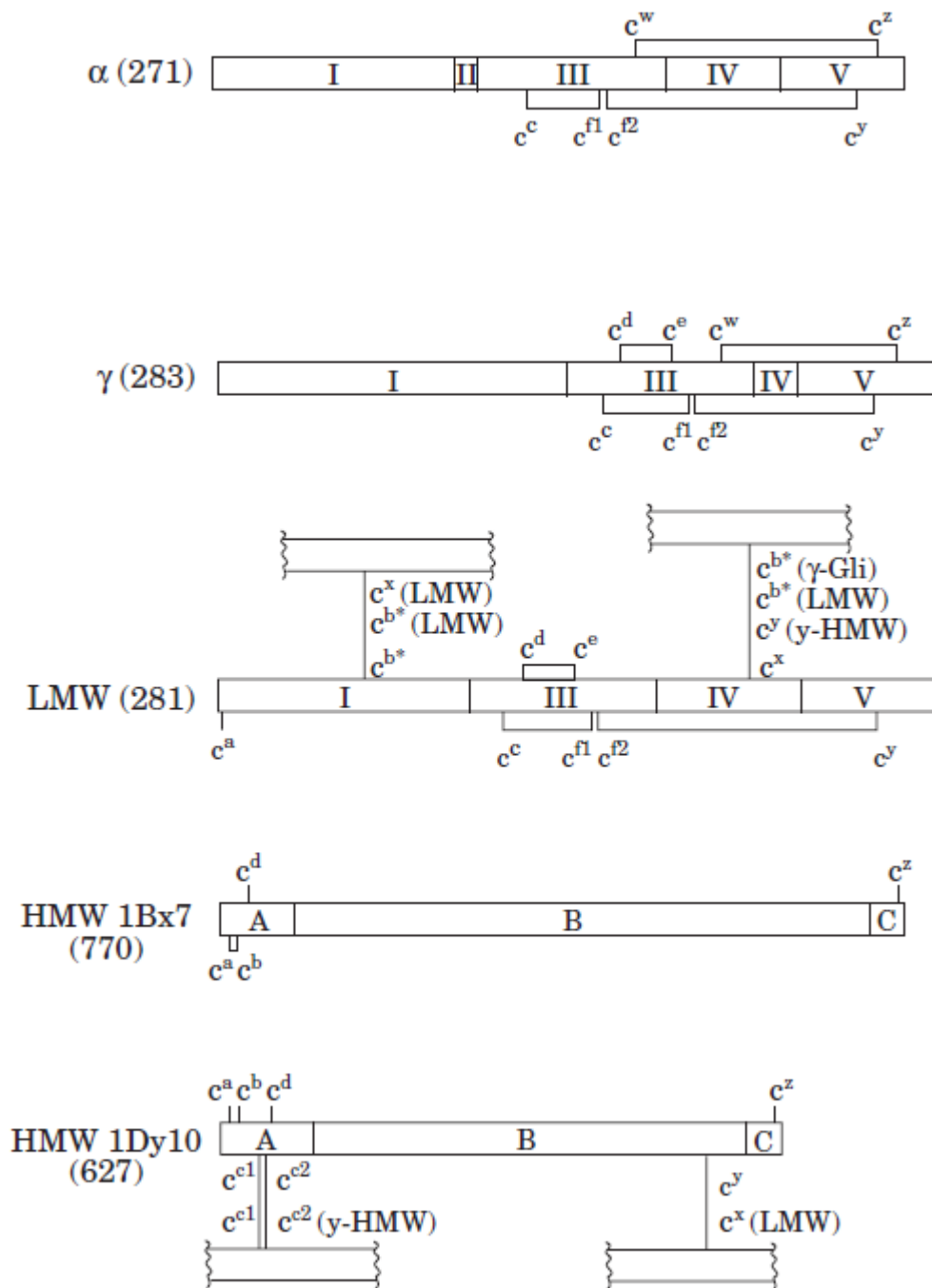


Figura 3: Estructuras esquemáticas de las gliadinas α y γ que interactúan con las subunidades de alto y bajo peso molecular de las gluteninas. Las letras c señalan la posición de las cisteínas y sus índices superiores fueron propuestos por Kohler et al. [26][28]. Se indican las secciones I-V para la familia LMW y las A-C para las HMW.

Las gluteninas de alto peso molecular (HMW) corresponden a la fracción minoritaria de las proteínas del gluten. Las gluteninas de alto peso molecular poseen tres dominios estructurales; el dominio "A", que se ubica en el extremo N-terminal, es no repetitivo y contiene de 80 a 105 residuos aminoacídicos. El dominio central repetitivo "B", que consiste en 480-700 residuos y el dominio C-terminal "C" compuesto por 42 residuos. Los

dominios A y C se caracterizan por tener aminoácidos cargados y la presencia de la mayoría de las cisteínas. El dominio B contiene repeticiones de hexapéptidos como QQPGQG formando un esqueleto central con hexapéptidos insertados (YYPTSP) y tripéptidos como QQP o QPG.

2.2.2 Toxicidad del gluten

Los principales componentes tóxicos para un celíaco se ubican en la gliadina y se caracterizan por tener una alta proporción de residuos de prolina y glutamina. Los residuos de prolinas presentes en hélices α producen giros bruscos debido a un impedimento estérico que surge de su cadena lateral cíclica, que también bloquea el átomo de nitrógeno de la cadena principal y evita que forme un enlace de hidrógeno, dificultando la acción de proteasas [31], [32]. De esa manera, la alta presencia de prolinas les confiere gran resistencia ante la acción de las enzimas del tracto digestivo, lo que permite que lleguen intactas al intestino delgado [31]. Una vez que llegan a esta sección del tracto digestivo, son reconocidos y desamidados por la enzima transglutaminasa tisular presente en la mucosa intestinal. Esta reacción enzimática le confiere el carácter tóxico a dichos péptidos ya que solo en su forma desamidada son reconocidos por las proteínas de membrana HLA-DQ2 o DQ8 de las células presentadoras de antígeno en pacientes celíacos [9].

Se ha identificado un péptido excepcionalmente inmunorreactivo que posee varios epítomos reconocibles por la transglutaminasa. Dicho péptido se encuentra en la α -gliadina, contiene 33 residuos aminoacídicos y cuya secuencia es LQLQPF**QPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP**F (en negrita se marcan los residuos de glutamina que son desaminados por la transglutaminasa tisular) [9]. Este péptido es ampliamente conocido como el más inmunodominante del gluten [32], porque contiene tres epítomos superpuestos; PFPQPQLPY (una copia), PYPQPQLPY (dos copias) y PQPQLPYPQ (tres copias) [33], que dan como resultado el inicio de una fuerte respuesta inmune. Para efectos prácticos se denominará como 33-mer a este péptido inmunorreactivo.

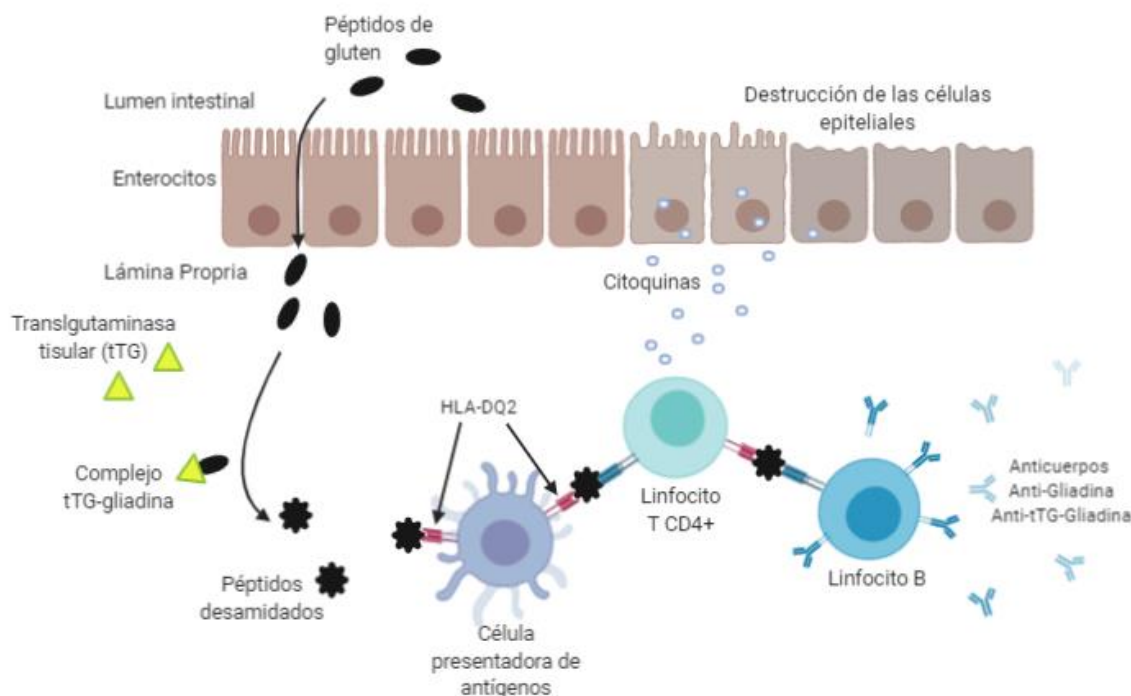


Figura 4: Diagrama de la respuesta inmune ante la ingesta de gluten en pacientes celíacos.

2.3 Masa madre

Por definición, masa madre es una masa donde coexiste un consorcio de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras. Dicho consorcio surge de la flora existente naturalmente en los granos y que, en determinadas condiciones, emerge de manera espontánea un cultivo estable de dichos microorganismos [34].

La masa madre ha sido utilizada en la panificación como agente leudante desde antes de la existencia de la levadura comercial [35]. Para utilizarla como fermento, se “alimenta” el stock de masa madre con una mezcla fresca de agua y harina en proporciones iguales. Se deja fermentar y solo hasta que duplique su volumen, puede ser utilizado como fermento para elaborar pan, puesto que es en este punto donde la masa madre alcanza su mayor actividad [36].

Durante la fermentación, los lactobacilos producen ácido láctico y acético, disminuyendo el pH típicamente por debajo de 5, mientras que las levaduras producen dióxido de carbono y etanol. Las condiciones cambiantes durante la fermentación contribuyen a la activación y aumento del rendimiento de las enzimas endógenas del trigo, tales como amilasas, proteasas, hemicelulasas y fitasas [37]. Los cambios inducidos por la activación de dichas enzimas, junto con los metabolitos microbianos, producen efectos importantes en el producto final. Aumento de la vida útil del producto, actividad antifúngica, aumento de biodisponibilidad de minerales, disminución del índice glicémico y aumento de prebióticos son algunos de los efectos positivos que se obtienen mediante esta fermentación [38]. Se ha comprobado también la capacidad proteolítica que tienen

algunas especies de lactobacilos en la destrucción de los epítomos responsables en la intolerancia al gluten [31].

Las bacterias acidolácticas son un grupo de bacterias gram-positivas, ácido-tolerantes, anaerobio-facultativas y producen ácido láctico como producto del metabolismo de azúcares. Según el tipo de azúcar que metabolizan, se clasifican por homofermentativas, heterofermentativas o heterofermentativas facultativas [39].

La ruta homofermentativa utiliza la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP o glucólisis) para producir piruvato y eventualmente transformándolo a ácido láctico. El NADH producido por la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato se reoxida a NAD^+ en la formación de lactato a partir de piruvato a través de la acción de lactato deshidrogenasas (LDHs) [40].

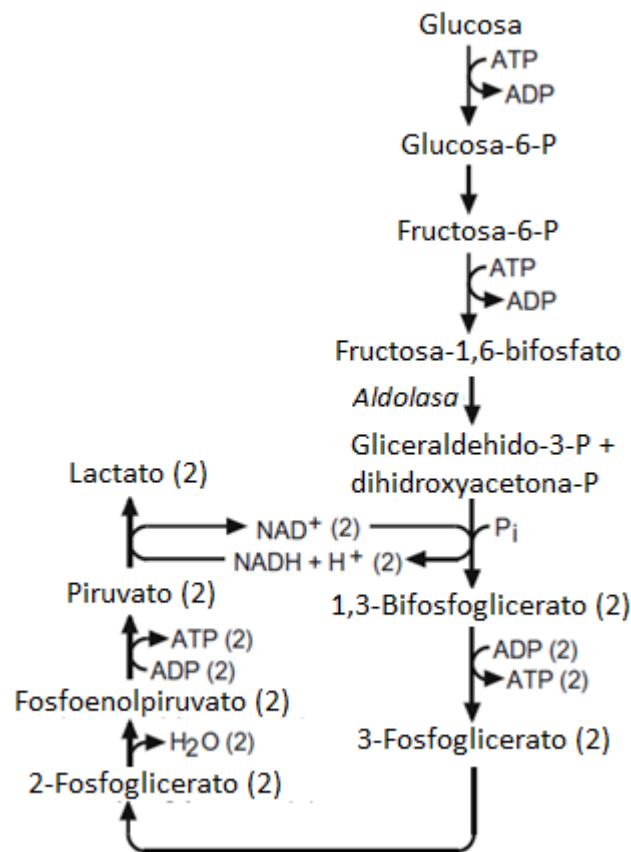


Figura 5: Ruta metabólica homofermentativa en la producción de ácido láctico. Adaptada de [37].

Esta vía produce 2 moles de ATP por cada mol de glucosa. La aldolasa, la enzima presente en aquellos microorganismos que poseen esta vía, cataliza la conversión de 1 mol de fructosa-1,6-bifosfato en 2 moles de gliceraldehído-3-fosfato. Las enzimas presentes en esta ruta son incapaces de metabolizar pentosas.

La ruta heterofermentativa, en cambio, carece de enzima aldolasa y tienen que recurrir a las rutas de pentosa fosfato o fosfoquetolasa. Por cada mol de glucosa, las bacterias producen 1 mol de lactato, 1 mol de CO₂ y ácido acético o etanol.

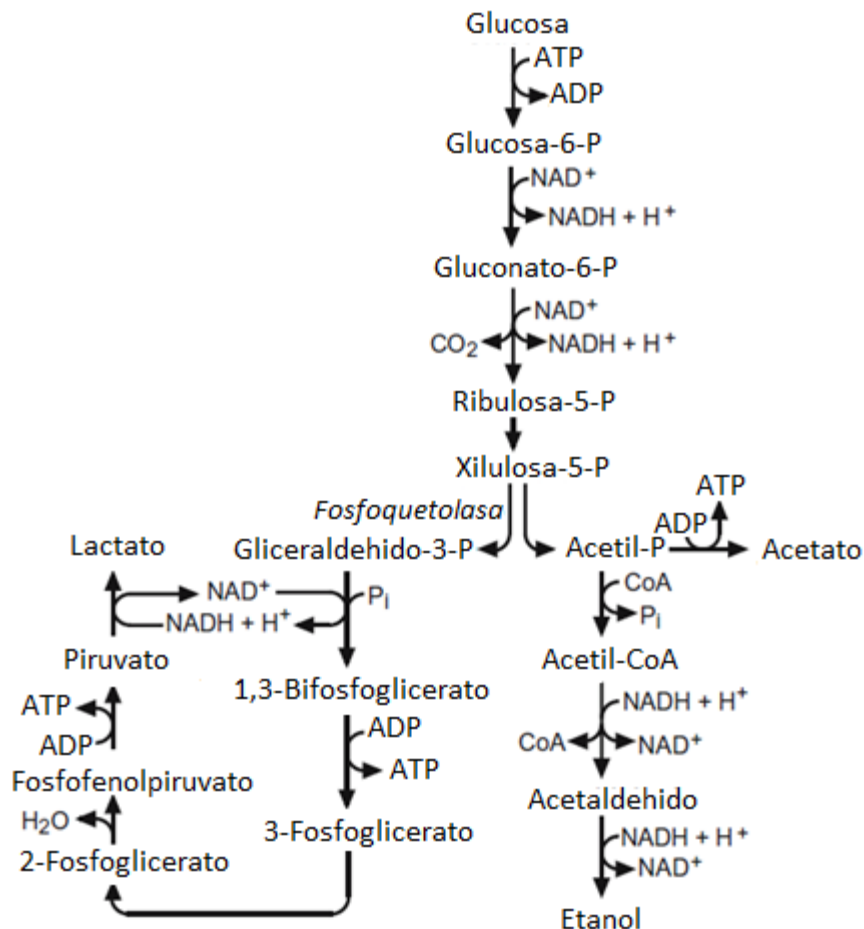


Figura 6: Ruta metabólica heterofermentativa ilustrando la producción de lactato, CO₂ y acetato o etanol. Adaptada de [37].

A diferencia de los microorganismos homofermentativos, estas bacterias no tienen aldolasa, pero poseen fosfoquetolasa, la enzima responsable de la escisión de la xilulosa-5-fosfato para formar gliceraldehído-3-fosfato y acetilfosfato. Debido a la biosíntesis de los azúcares de cinco carbonos en esta vía (ribulosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato), algunas cepas pueden utilizar pentosas como la ribosa, la xilosa y la arabinosa [41].

Para el caso de las bacterias heterofermentativas facultativas, normalmente utilizan la vía EMP para metabolizar azúcares al igual que las homofermentativas. Sin embargo, poseen una fosfoquetolasa inducible por pentosas que activan la vía heterofermentativa [42].

Tabla 2: Bacterias ácido lácticas generalmente encontradas en masas madres. Adaptado de [43].

Heterofermentativas	Heterofermentativas facultativas	Homofermentativas
<i>Lb. acidifarinae</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. amylovorus</i>
<i>Lb. arevis</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. auchneri</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. delbrueckii i</i>
<i>Lb. aermentum</i>	<i>Lb. paralimentarius</i>	<i>Lb. farcimini</i>
<i>Lb. fructivorans</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. mindesis</i>
<i>Lb. fermenti</i>		<i>Lb. crispatus</i>
<i>Lb. panis</i>		<i>Lb. johnsonii</i>
<i>Lb. pontis</i>		<i>Lb. Amylolyticus</i>
<i>Lb. reuteri</i>		<i>L. lactis</i>
<i>Lb. rossiae</i>		
<i>Lb. sanfranciscensis</i>		
<i>Lb. siliginis</i>		
<i>Lb. spicheri</i>		
<i>Lb. zymae</i>		
<i>Lb. helveticus</i>		

Al igual que los lactobacilos, se han encontrado más de 20 especies de levaduras en masas madres. Las más frecuentes tienden a ser *Saccharomyces exiguus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Candida krusei*, *Pichia anómala*, *Pichia satoi*, *Torulaspota delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia membranifaciens* [44]. En general se encuentra una relación levadura/BAL de 1:100 [45] y la composición del consorcio depende fuertemente tanto de las condiciones ambientales tales como temperatura de incubación e hidratación de la masa como de los ingredientes, incluyendo tipo de cereal, contenido de sal, materia grasa, entre otros [41].

Los lactobacilos son los responsables de la textura, sabor, aromas y el aumento de la vida útil de los panes elaborados con masa madre, debido a la acidificación y proteólisis que conlleva su fermentación [46]. La proteólisis que ocurre en la fermentación de la masa madre estimula la interacción entre levaduras y BAL por medio de la liberación de aminoácidos libres que benefician el crecimiento de las primeras [47]. Por otro lado, los aminoácidos libres contribuyen directamente o como precursores del desarrollo de sabores y aromas en la elaboración de panes con masa madre [48]. La proteólisis promueve a su vez la degradación del gluten, que estaría directamente relacionado con la textura y la vida útil del producto final [46]. Si bien la proteólisis no se debe solo a la presencia de bacterias ácido lácticas; dos tercios de esta hidrólisis se produce a causa de ellos y el resto se debe a las enzimas naturalmente presentes en la harina [45], [46], [47].

2.4 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL), incluyendo miembros del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus*, se caracterizan por presentar múltiples auxotrofías asociadas a aminoácidos [49]. Para compensar esta característica, las BAL poseen un complejo sistema proteolítico que les permite proliferar en ambientes cuya fuente principal de nitrógeno son proteínas de gran tamaño y a veces de difícil acceso a proteasas [50]. Esta característica les confiere un papel protagónico en la industria de alimentos fermentados, principalmente en la industria de los lácteos por su efecto en la producción de sabores, texturas, aromas, aumento de la biodisponibilidad de nutrientes, producción de péptidos bioactivos, entre otros [37], [51], [52], [53].

2.4.1 Sistema proteolítico de las BAL

En la fermentación de productos lácteos, el sistema proteolítico de las BAL juega un rol importante ya que permiten que estas bacterias crezcan en la leche. Las bacterias ácido lácticas requieren una fuente externa de aminoácidos, los cuales se obtienen a partir de la proteólisis de la caseína, la proteína más abundante y la principal fuente de aminoácidos de la leche [54].

El primer paso en la digestión de la caseína por las bacterias ácido lácticas comienza por una serin-proteínasa (Prt) ubicada en la envoltura celular denominada CEP (por sus siglas en inglés *cell-envelope proteinase*). Esta proteasa degrada la caseína en oligopéptidos que a su vez son transportados al interior de la célula por sistemas de transporte de oligopéptidos (Opp) para ser reducidos a aminoácidos por la acción de distintas peptidasas intracelulares [50], [55]. No todas las bacterias ácido lácticas poseen CEP's, por lo que dependen de otras BAL que si lo tengan para la obtención de aminoácidos. Este sistema es de interés económico puesto que contribuye a la formación de texturas y sabores en los productos lácteos fermentados [54].

En las bacterias del género *Lactococcus*, los genes que codifican para el CEP pueden estar asociados a plasmidios o al genoma, mientras que para *Lactobacillus* son asociados al genoma únicamente. En general, las BAL tienen solo un CEP, aunque se han reportado hasta 4 distintos en algunas variedades de *Lactobacillus*. Por lo general, dentro de cada especie puede variar la cantidad de CEP's según la variedad de lactobacilo [56], [57]. Se caracterizan por ser proteasas activadas por Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , inhibidas por Co^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , EDTA, e inhibidores de serin-proteasas como PMSF, DFP y DCI [58].

El tamaño de los CEP comprende aproximadamente 2000 residuos aminoacídicos y se componen de distintos dominios funcionales. Desde el extremo N-terminal, el CEP incluye el prepro-dominio (PP) que corresponde a una secuencia señal (~40 residuos) para la secreción del péptido y a una pro-secuencia (~150 residuos) que se remueve por efectos autocatalíticos; un dominio catalítico serin-proteasa (PR) (~500 residuos); un dominio de inserción (I) (~150 residuos) asociado a la modulación de la especificidad del sustrato; un dominio A de función desconocida (~400 residuos); el dominio B (~500 residuos) asociado a la estabilización de la actividad/especificidad del CEP; el dominio helicoide H (~200 residuos) involucrado en el posicionamiento de los dominios A y B fuera de la célula; el dominio W (~100 residuos) que atraviesa la capa de peptidoglicano funcionando como un espaciador de la pared celular y por último, el dominio AN que se ancla a la membrana celular [59], [60]. No todos los dominios están presentes en cada

CEP, lo que sugiere que estas proteínas multidominio son el resultado de la combinación de genes y el intercambio de dominios durante su evolución [61].

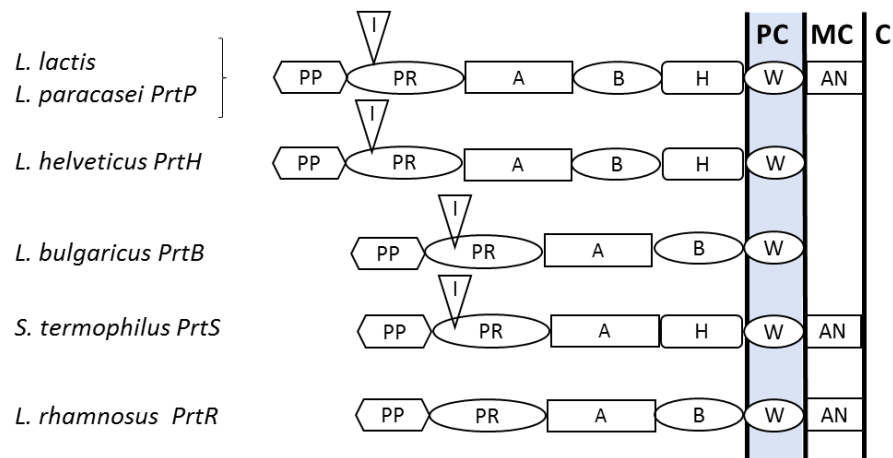


Figura 7: Representación de los CEP's de distintas bacterias ácido lácticas. Con citoplasma C, membrana celular MC, pared celular PC y prepro-dominio PP, dominio catalítico PR, dominio de inserción I, dominio A, dominio B, dominio helicoidal H, dominio espaciador W y dominio de anclaje AN. Adaptado de Siezen et. al [61].

Los CEP's tienen una fuerte preferencia por la caseína, las proteínas más abundantes en la leche [62]. Las caseínas se dividen en caseínas α 1-, α 2-, β - y κ ; cada uno contiene una gran cantidad de residuos de prolina que evitan la formación natural de hélices α y láminas β . Estas características en las estructuras secundarias conducen a una molécula abierta no estructurada susceptible a la acción de los CEP [63].

El segundo paso en la utilización de la caseína consiste en el transporte de los péptidos generados por CEP al interior de la célula, por medio del sistema de transporte de oligopéptidos (Opp) que pertenece a la familia de transportadores dependientes de ATP [64]. Estos se caracterizan por ser de baja especificidad [65] y pueden transportar péptidos de hasta 18 residuos [66].

Otros transportadores de péptidos incluyen un transportador di y tripéptido DtpT impulsado por la fuerza motriz de protón (PMF) y un sistema de transporte di, tri y tetrapéptidos Dpp impulsado por ATP [67], [68]. Dpp es capaz de transportar di, tri y tetrapéptidos que contienen aminoácidos relativamente hidrófobos y muestra mayor afinidad por tripéptidos [69], mientras que DtpT tiene preferencia para dipéptidos y tripéptidos más hidrofílicos y cargados [67].

Después de que los péptidos son transportados al interior de las células, se degradan por la acción concertada de peptidasas presentes en el citoplasma. Varias peptidasas se han caracterizado a partir de LAB incluyendo endopeptidasas (PepO, PepE, PepF y PepG), aminopeptidasas (PepN, PepC, PepS y PepA) y prolil endopeptidasas (PepQ, PepI, PepR, PepX y PepP) [55]. La gran mayoría corresponde a metalopeptidasas aunque se han encontrado otras dependientes de tior [70], además, se caracterizan por su incapacidad para hidrolizar caseína intacta [55].

Las endopeptidasas intracelulares PepO, PepE, PepF y PepG, con las aminopeptidasas generales PepN y PepC, junto con las la prolil dipeptidil aminopeptidasa PepP y PepX son las primeras enzimas que actúan sobre los oligopéptidos. Los di y tripéptidos se someten luego a una escisión adicional por la tripeptidasa (PepT) y las dipeptidasas (PepV y PepD) [55], [66], [60]. Un resumen de la especificidad de las peptidasas intracelulares se detalla en la tabla 3.

Tabla 3: Peptidasas intracelulares caracterizadas de las bacterias ácido lácticas [57].

Tipo	Peptidasa	Especificidad
Endopeptidasas	PepO, PepE, PepF y PepG	$\text{NH}_2\text{-X}_n\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Aminopeptidasas	PepN, PepC, PepS PepL, PepA	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$ $\text{NH}_2\text{-Glu/Asp}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$
Tripeptidasas	PepT	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X-X-COOH}$
Dipeptidasas	PepD y PepV	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{X-COOH}$
Prolin peptidasas	PepQ PepI PepR PepX PepP	$\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{Pro-COOH}$ $\text{NH}_2\text{-Pro}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$ $\text{NH}_2\text{-Pro}\downarrow\text{X-COOH}$ $\text{NH}_2\text{-X-Pro}\downarrow\text{X}_n\text{-COOH}$ $\text{NH}_2\text{-X}\downarrow\text{Pro-X}_n\text{-COOH}$

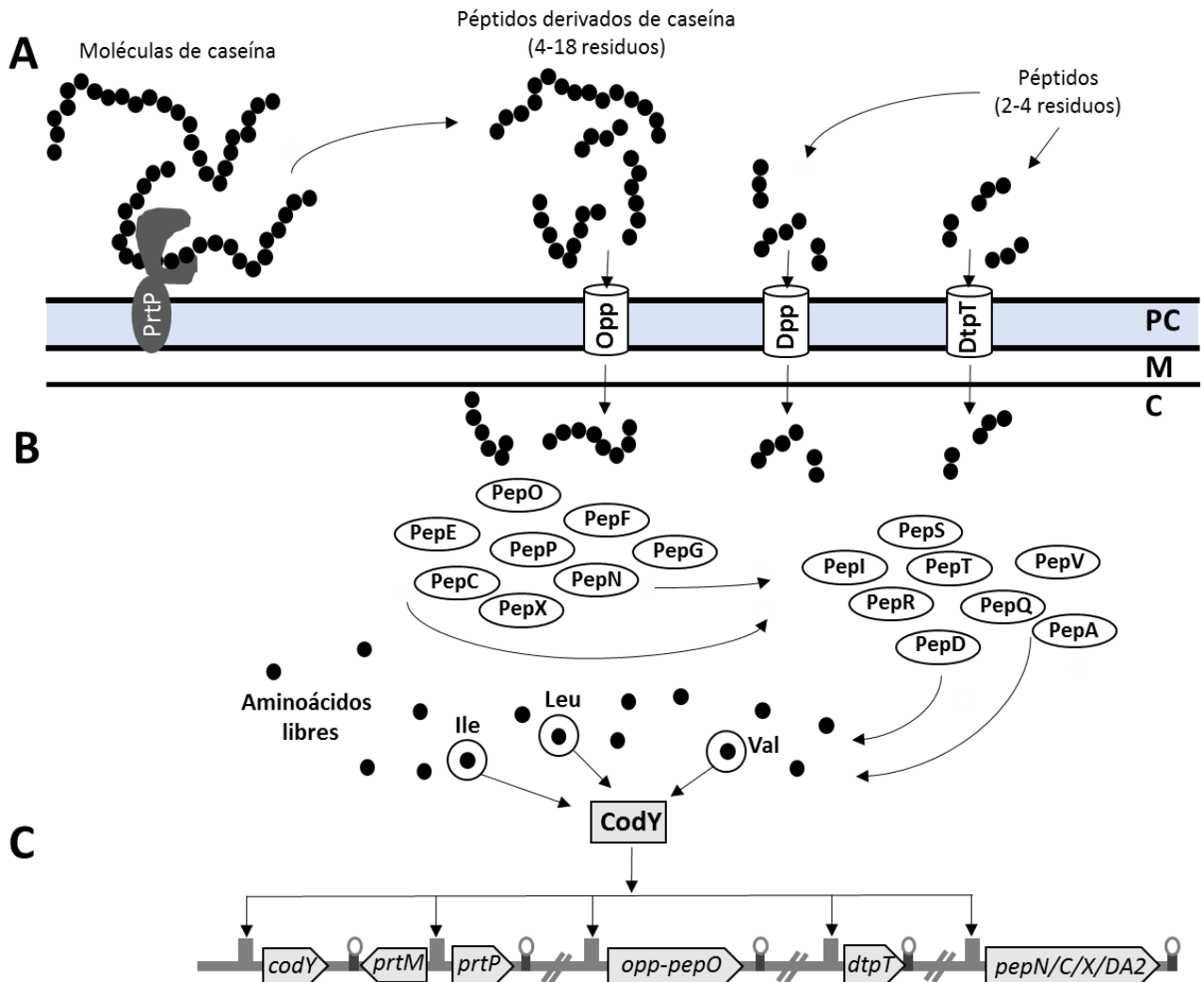


Figura 8: Resumen esquemático de la función y regulación del sistema proteolítico de *Lactococcus Lactis* en la digestión de caseína. A. Una proteinasa de envoltura celular PrtP, permeasa de oligopéptido Opp, transportador iónico para di y tri péptidos DtpT y el transportador dependiente de ATP Dpp para péptidos entre 2 y 4 residuos. B. Peptidasas intracelulares. PepO y PepF son enopeptidasas, PepN/PepC/PepP son aminopeptidasas generales, PepX una X-prolil dipeptidil aminopeptidasa, PepT una tripeptidasa, PepQ una prolidasa, PepR una prolinasa, PepI un prolin iminopeptidasa y PepD y PepV dipeptidasas. C. El represor transcripcional CodY, censa la presencia de aminoácidos ramificados (BCAA's). Usando estos aminoácidos como cofactores, reprime la expresión de genes que constituye el sistema proteolítico de *Lactococcus Lactis*. Imagen adaptada de Kirsi et. al [54].

El transportador Opp es esencial para la nutrición de nitrógeno, mientras que los transportadores di y tripéptidos (Dpp y DtpT) no son directamente relevantes para la utilización de oligopéptidos derivados de caseína, ya que los CEP no forman cantidades significativas de aminoácidos libres, dipéptidos o tripéptidos [71]. En cambio, algunos autores sugieren que los transportadores de di y tripéptidos desempeñan un papel en la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno [72], [73], [74].

CodY es un regulador transcripcional que tiene afinidad por las secuencias que preceden al operón Opp; la caja CodY (AATTTTCWGAAAATT), además, los aminoácidos

ramificados o BCAA estimulan esta unión, reprimiendo varios componentes del sistema proteolítico de las BAL [75]. De esta manera, CodY reprime el sistema proteolítico en un medio rico en péptidos y/o aminoácidos [73], [76]. El sistema proteolítico recién descrito corresponde específicamente al de *Lactococcus lactis*. No obstante, debido a la similitud de los genes asociados a este sistema entre bacterias ácido lácticas, autores sugieren que corresponden a sistemas homólogos [77].

Dependiendo de la presencia de genes específicos asociados al sistema proteolítico, las BAL pueden subdividirse en *starters* y *non-starters*. Las variedades *starters* corresponden a las que producen proteinasas asociadas a la envoltura celular y son capaces de sobrevivir en ambientes con proteínas de alto peso molecular como única fuente de nitrógeno. A su vez, las variedades *non-starters*, no poseen genes que codifiquen CEP's, por lo que dependen de la presencia de oligopéptidos en el ambiente para sobrevivir. Sin embargo, variedades *non-starters* pueden desarrollarse en ambientes con proteínas como única fuente de nitrógeno solo si conviven con variedades *starters*, que generen péptidos como producto de la acción de las CEP sobre las proteínas [54], [78].

2.4.2 Especificidad de las proteinasas asociadas a la envoltura celular

Como ya se mencionó, las proteinasas asociadas a la envoltura celular de las BAL corresponden al grupo de las serín-proteasas (S). Este grupo lo conforman proteasas cuyo aminoácido nucleofílico del sitio catalítico es la serina. Las dos familias más importantes de este grupo corresponden a las serín-proteasas tipo subtilisina o subtilasas (S8) y las de tipo quimotripsina (S1) [79]. Las subtilasas tienen una triada catalítica en el orden Asp, His y Ser en su secuencia, que las diferencia de las otras familias de las serín-proteasas. En particular, los CEP pertenecen a la familia de las subtilasas, específicamente a la subfamilia S8A, en que en los residuos del sitio activo se encuentran con frecuencia en las secuencias Asp-Thr/Ser-Gly, His-Gly-Thr-His y Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Xaa-Pro [79], [80], [81]. Los miembros de la familia S8 se caracterizan por ser endopeptidasas, termoestables, con temperaturas óptimas entre los 30-40°C y activas a valores de pH entre 7 y 8 [80].

Las subtilasas (S8) se encuentran en bacterias, arqueas y eucariotas inferiores y cumplen las funciones de defensa o utilización de proteínas como fuente de nitrógeno. Se caracterizan por ser enzimas extracelulares y ser inespecíficas. Existe un alto grado de variabilidad de la secuencia entre distintos ejemplares de subtilasas, pudiendo observar inserciones o deleciones en su secuencia. Con la excepción de los tres residuos catalíticos Asp-His-Ser, prácticamente cualquier otro residuo puede ser reemplazado por uno o más residuos diferentes [82].

Como las proteinasas asociadas a la envoltura celular de las BAL, la mayoría de las subtilasas se sintetizan como pre-pro-enzimas que posteriormente se translocan a la membrana celular a través del pre-péptido (o péptido señal), y finalmente se activa la escisión del pro-péptido. No obstante, existen excepciones tales como que los pro-péptidos estén ausentes o que, en algunos casos, estas proteasas se ubiquen al interior de la célula. El tamaño de estas proteasas varía entre 266 a 1775 residuos. El dominio catalítico siempre se encuentra en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos directamente después de la región pre-pro [83].

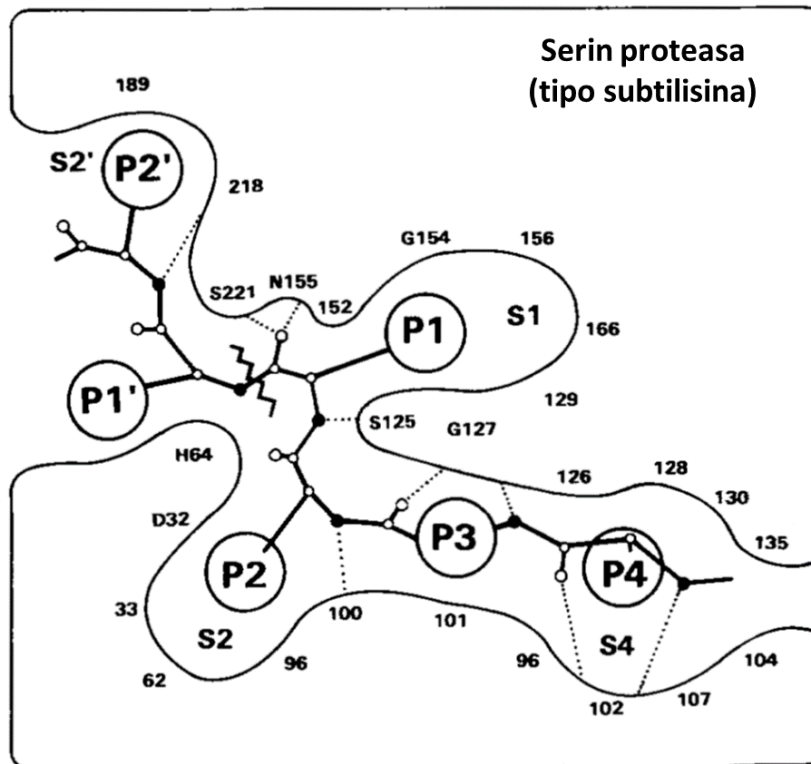


Figura 9: Representación esquemática de la unión del sustrato (líneas en negrita) a una serín proteasa de tipo subtilisina (superficies lisas). Nomenclatura P4-P2' y S4-S2' según Schechter y Berger (1967) [84]. Los bolsillos del lado N-terminal del enlace escindible se enumeran como S1-S4. Las cadenas laterales de los residuos P4-P2' se muestran como esferas grandes; Las posiciones de los residuos enzimáticos que pueden interactuar con estas cadenas laterales P4-P2' se muestran alrededor de los sitios de unión (S1, S2, etc.). La numeración de los residuos corresponde específicamente a la de la subtilisina BPN', perteneciente a la familia S8A. Los enlaces de hidrógeno entre la enzima y el sustrato se muestran como líneas punteadas, y el enlace peptídico del sustrato, que se escindiré, se muestra mediante una línea dentada. Se indican los residuos catalíticos D32, H64 y S221, y el residuo de agujero de oxianión N155. Imagen adaptada de [79]

El sitio catalítico de las subtilasas se describe generalmente como un canal capaz de alojar al menos 6 residuos aminoacídicos (P4-P2') de un sustrato. Los seis residuos interactúan con el sitio catalítico en distinta intensidad según la topología y naturaleza de los residuos que componen los distintos sitios de unión. En particular, los bolsillos S1 y S4 son los determinantes en la especificidad hacia los sustratos. Ambos bolsillos se caracterizan por ser grandes e hidrofóbicos. La preferencia de aminoácidos en el bolsillo S1 es hacia los residuos Tyr (T), Phe (F) > Leu (L), Met (M), Lys (K) > His (H), Ala (A), Gln (Q), Ser (S), mientras que para S4, su preferencia apunta hacia Phe (F) > Leu (L), Ile (I), Val (V) > Ala (A). Cabe destacar que mientras existan modificaciones en los residuos de las subtilasas, la afinidad de los bolsillos del sitio activo puede variar y por ende contribuir a que existan diferencias entre las especificidades dentro de los ejemplares de esta familia [82].

Como se mencionó anteriormente, el estudio del sistema proteolítico las bacterias ácido lácticas se ha centrado mayormente en la industria de los lácteos, sin embargo, estas

bacterias se encuentran en alimentos fermentados, incluyendo embutidos, *pickles*, salsas, masa madre, entre otros. A diferencia de la leche, el trigo contiene proteasas que actúan directamente sobre el gluten, la principal fuente de proteína del trigo [77]. Estas son proteasas aspárticas cuya actividad se maximiza a pH 4.0 y pueden hidrolizar el gluten, produciendo péptidos de menor tamaño que pueden ser utilizados directamente por bacterias ácido lácticas *non-starter* [85], [86]. Sin embargo, masas fermentadas con cultivos que expresan CEP muestran un deterioro de gluten significativamente mayor que su contraparte fermentada con BAL *non-starters*, lo que se expresa en una disminución de elasticidad y una menor capacidad de retención de gases [87]. Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, este trabajo se sustenta en la hipótesis que lactobacilos presentes naturalmente en masas madres pueden constituir una herramienta eficaz en la eliminación de los epítomos del gluten responsables de la respuesta inmune en celíacos.

En cuanto al estado del arte de este tipo de tecnología, investigaciones se han enfocado en la suplementación de las proteasas del tracto digestivo, con proteasas provenientes de *Flavobacterium meningosepticum* como un tratamiento preventivo para celíacos (2002) [88]. Otros autores se han enfocado en el tratamiento de harina de trigo con proteasas provenientes de *Lactobacillus* y *Aspergillus*, obteniendo reducciones considerables en la concentración de gluten del producto final (2018) [89]. Del mismo modo, este trabajo se enfoca en aislar lactobacilos provenientes de masas madres con capacidad de producir proteasas que puedan degradar péptidos de gliadina relacionados con la respuesta inmune en celíacos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad proteolítica de *Lactobacillus* aislados a partir de masa madre sobre los péptidos ricos en prolina y glutamina (PPG) de gliadina.

3.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Obtener un complejo proteico con PPG para ser utilizados como fuente de nitrógeno en medios de cultivo definidos.

Objetivo específico 2: Obtener el consorcio de bacterias ácido lácticas existente en la masa madre.

Objetivo específico 3: Seleccionar los microorganismos del consorcio de bacterias ácido lácticas de masa madre que toleren mejor los PPG como única fuente de nitrógeno.

Objetivo específico 4: Evaluar la degradación de gliadina con los lactobacilos seleccionados con PPG.

Objetivo específico 5: Evaluar la degradación epítipo 33-mer de la alfa-gliadina en cultivos de *Lactobacillus* provenientes de masa madre.

4 Materiales y Metodología

4.1 Medios de cultivo

Para el cultivo de los lactobacilos se utilizaron dos medios; De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y uno definido químicamente (CDM). El primero consiste en un medio complejo diseñado para el aislamiento de lactobacilos desde alimentos fermentados [90] y en este caso particular se utilizó como medio basal, mientras que el segundo fue diseñado para estudiar las auxotrofías de *Lactobacillus Plantarum* [91] y se utilizó como medio para seleccionar lactobacilos según su capacidad de hidrolizar péptidos de gliadina. Ambos fueron modificados según disponibilidad de componentes en el laboratorio o por razones específicas de cada experimento. La composición y los detalles de cada uno se encuentran en el Anexo 3.

4.2 Obtención de gliadina

La extracción de gliadina se obtuvo a partir de harina de trigo (harina de fuerza, molino La Estampa), siguiendo el protocolo de Weiss et. al [92] modificado según la disponibilidad de instrumentos en el laboratorio.

La harina se sometió a un protocolo de extracción secuencial por solventes. Primero, por cada 200 gr de harina, se añadió 1 litro de Tris-HCl (50 mM, pH 8,8) y se mantuvo en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se centrifugó a 20.000 g por 20 minutos y se descartó el sobrenadante que contenía las fracciones solubles en soluciones salinas (albuminas y globulinas). El proceso anterior se repitió dos veces para eliminar contaminación de estos péptidos en el extracto de gliadina. El precipitado de la centrifugación se lavó con agua destilada, se resuspendió en 2 litros de etanol 70% y se mantuvo en agitación (200 RPM) por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó por 20 minutos a 20.000 g, se descartó el pellet y se recuperó el sobrenadante conteniendo las gliadinas.

Una vez obtenido el extracto de gliadina, se concentró la proteína usando un equipo de ultrafiltración (Amicon 8200) con una membrana de tamaño de poro de 10 kDa y se almacenó a temperatura ambiente. Se estimó una concentración de 3 g/L de la solución final mediante un ensayo de Bradford, siguiendo las indicaciones del Anexo 2.

4.3 Obtención del péptido de alimentación

La extracción de gliadina se obtuvo a partir de 200 gr de harina de trigo (harina de fuerza, molino La Estampa) como se explicó en el apartado anterior, siguiendo el protocolo de Weiss et. al [92], pero sin la etapa de ultrafiltración. La solución alcohólica resultante que contiene la gliadina se sometió a un proceso de secado en incubadora a 37°C para eliminar el etanol. Una vez evaporada casi la totalidad del alcohol (cerca de un cuarto del volumen inicial), se resuspendió por goteo en 1500 ml de *buffer* de digestión Tris-HCl 100 mM, pH 8 y CaCl₂ 20 mM y se agregaron enzimas tripsina (30 mg/L) y quimotripsina (30 mg/L), manteniendo en agitación a una temperatura de 37°C por 1 hora. La solución de digestión se centrifugó a 14.000 g por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet*. Se evaporó el agua del *pellet* a temperatura ambiente toda la noche, se recuperó el sólido y se almacenó a 4°C. Al sólido recuperado se le denominó como "PPG" para simplificar la escritura.

Para elaborar 1 litro de medio CDM-PPG, se resuspendieron 3 gr secos en 30 ml de etanol 70%, se agregó por goteo y con agitación a la solución autoclavable del medio CDM (ver Anexo 3.1) y se autoclavó.

4.4 Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos se obtuvieron a partir de una masa madre activa, según se mencionó en antecedentes. Para esto, se mezclaron 30 ml agua de la llave y 30 gr de harina de trigo (harina de fuerza, molino La Estampa) hasta formar una masa homogénea. La masa resultante se inoculó con 3 gr de masa madre que estuvo almacenada a 4°C y se revolvió hasta formar una masa homogénea. Se dejó fermentar a 37°C hasta que la masa doblara su volumen y solo entonces se extrajeron 2,5 gr de masa activa para inocular 50 ml de medio MRS, incubando por 8 horas a 37°C y 200 RPM. Pasado el tiempo de incubación, se extrajeron 100 µL para inocular 50 ml de medio MRS con cicloheximida (Fluka) para eliminar las levaduras del cultivo. Para disminuir al máximo el arrastre de partículas de harina y de levaduras, se hicieron tres cultivos secuenciales con cicloheximida. El cultivo final consistió en el conjunto de bacterias ácido lácticas cultivables de la masa madre sin la presencia de levaduras, por lo que se le denominó consorcio de BAL. Con el consorcio se preparó un *stock* glicerol al 20% y se almacenó a -80°C.

4.5 Selección de microorganismos según su capacidad de utilizar PPG como fuente de nitrógeno

Se probaron dos técnicas para la selección de BAL: por evolución artificial en cultivo continuo y por plaqueo. A continuación, se describen ambas.

4.5.1 Por evolución artificial en cultivo continuo

Se construyó un fermentador continuo de 12 ml de volumen máximo de cultivo. La manguera que alimentaba con medio de cultivo al fermentador se conectó, por medio de un divisor de flujo, a las botellas que almacenaron dos medios de cultivo distintos, CDM-Triptona y CDM-PPG. Cada botella contaba con llaves de paso para cambiar de medio de alimentación según requiriera el experimento. Una bomba peristáltica de bajo flujo (Microfluidic multichannel BT100-1L, Longerpump) impulsaba el medio de cultivo de las botellas al fermentador, permitiendo un flujo variable entre 70 µl/min y 5.000 µl/min. Se implementó un sistema de agitación por inyección de aire, utilizando una bomba de acuario, un filtro de aire de 0,2 micras y una pinza que estrangulaba la manguera para regular el flujo. Al igual que la alimentación, el aire se inyectó al fondo del fermentador, por medio de una aguja que conectaba la manguera con el fondo. El fermentador se construyó con un tubo de ensayo de 15 ml con una tapa de goma asegurada con una tapa rosca. Por la goma atravesaban 3 agujas; una para aireación/agitación, otra para la alimentación y la tercera servía de rebalse y permitía regular el volumen de cultivo. La temperatura del fermentador se reguló con un baño seco (Dlab, HB120-S).

Las botellas, mangueras y el fermentador fueron autoclavados, sin embargo, las llaves de paso no soportaban las condiciones de autoclavado por lo que el segmento entre la llave de paso y la conexión en T se remojaron 1 hora en etanol 70% y fueron expuestos a 20 minutos de luz ultravioleta. Las conexiones se realizaron bajo esterilidad en una campana de flujo laminar.

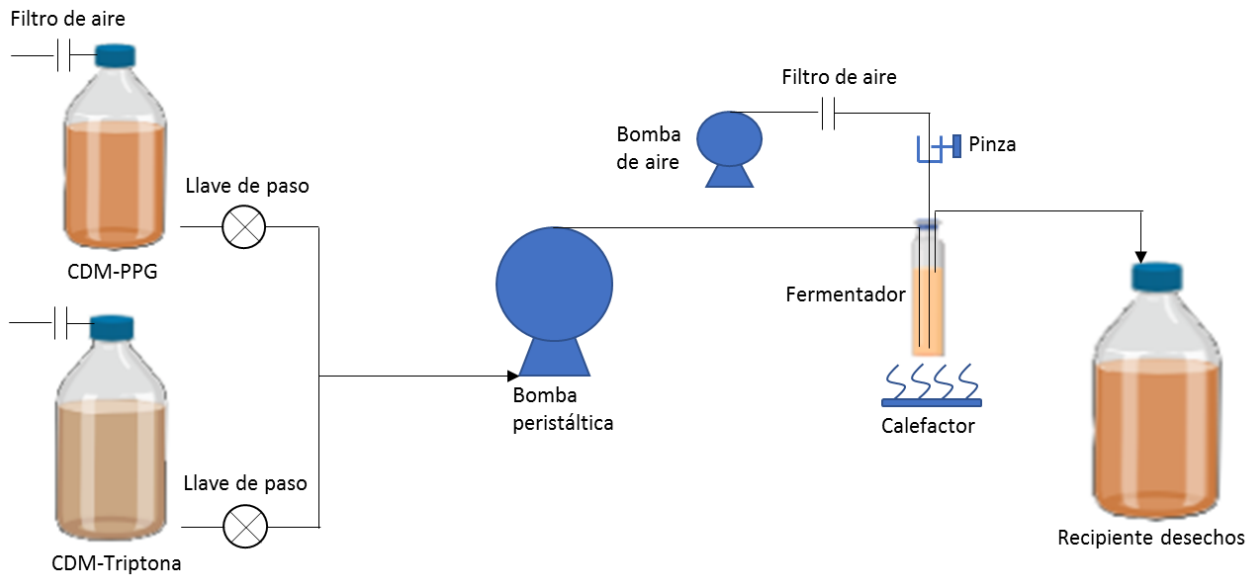


Figura 10: Esquema de funcionamiento del fermentador continuo.

El fermentador se inoculó con el consorcio de BAL en medio CDM-Triptona y se mantuvo a 37°C solo con agitación hasta que el medio se observó turbio. Una vez establecido el cultivo, se alternó la alimentación entre medio CDM-Triptona y CDM-PPG para ejercer presiones selectivas en el medio. Se alimentó con CDM-PPG hasta observar una disminución significativa en la OD del cultivo y luego se reestableció dicho valor con medio CDM-Triptona.

La toma de muestras del cultivo se obtenía directamente de la manguera de rebalse que conectaba al recipiente de desechos. El flujo de medio de cultivo se calculó según la tasa de crecimiento específico máximo (μ_{max}) para *Lactobacillus* cultivados en CDM, equivalente a 0,6 h⁻¹ [93]. De esta manera se calculó que la tasa de dilución crítica o el flujo máximo que se pudo inyectar al fermentador equivalía a 120 μ L/min (ver Anexo 5).

4.5.2 Por placas en medios semi sólidos

Se construyeron tres medios en agar; MRS, CDM-Triptona y CDM-PPG y se agregaron 15 ml de cada uno en placas Petri. A las placas de CDM-Triptona y CDM-PPG se le trazaron líneas perpendiculares a modo de cuadrante. Paralelamente se realizó un cultivo *overnight* con MRS en medio líquido a 37°C y 200 rpm, inoculado con el consorcio de BAL. Una vez colonizado el medio, se hizo una dilución 1:10.000 del cultivo en el mismo medio MRS, se sembró una placa con MRS agar en triplicado y se mantuvo a 37°C *overnight* o hasta obtener colonias de 1 mm de diámetro aproximadamente. Se seleccionaron 30 colonias al azar y con ayuda de puntas estériles de micropipeta, se sembraron en los cuadrantes respectivos de las placas con CDM-Triptona y CDM-PPG, en duplicado. Las placas se mantuvieron a 37°C *overnight* o hasta observar crecimiento de colonias. Las 9 colonias que mostraron crecimiento en CDM-PPG fueron recolectadas, enumeradas del 1 al 9 y cultivadas separadamente en 10 ml de MRS a 37°C y 200 rpm por 8 horas. Se preparó un stock glicerol al 20% de cada colonia cultivada y se almacenaron a -80°C.

4.6 Cultivo y fraccionamiento Celular

El fraccionamiento de las colonias que mostraron crecimiento en medios con PPG se obtuvo según el método modificado de Hegazi et. al. [94]. Brevemente, la colonia a estudiar fue cultivada en 60 ml de medio MRS a 30°C por 18 horas y luego se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos. Del sobrenadante se obtuvo el medio extracelular (M.E), mientras que el *pellet* se lavó dos veces con *buffer* fosfato 0,1 M KH₂PO₄ (pH 7.0) y se resuspendió en 6 ml del mismo *buffer* fosfato. Se extrajeron 500 µL del *pellet* resuspendido, obteniendo las células (Cel.) en suspensión. Al resto del *pellet* resuspendido se le agregó lisozima (1 mg/ml) y se incubó por 1 hora a 30°C. Las células con lisozima se lisaron por sonicación en un programa de 6 minutos de sonication efectivo con 32% de intensidad, con ciclos de 5 segundos de sonication y 25 de descanso. Una vez sonicadas, la mezcla se centrifugó a 12.000 g por 1 hora y se recuperó el sobrenadante que corresponde al extracto citoplasmático (E.C). El *pellet* se lavó 3 veces con el *buffer* fosfato 0,1 M KH₂PO₄ (pH 7.0) y luego se resuspendió en 6 ml del mismo *buffer* fosfato, obteniendo la fracción correspondiente a las membranas celulares (Mem). El medio extracelular (M.E), las células (Cel), el extracto citoplasmático (E.C) y las membranas celulares (Mem) se almacenaron a -80°C

4.7 Ensayos de digestión

Para evaluar la capacidad proteolítica de las fracciones celulares (medio extracelular, extracto citoplasmático, las membranas y las células) de cada colonia sobre gliadina, se realizaron ensayos de digestión enzimática siguiendo el protocolo modificado de Hegazi et. al. [94]. Brevemente, para cada fracción celular se elaboró una mezcla de reacción que consistió en 75 µL de solución de gliadina (Gl), 185 µL de *buffer* 0,1 M KH₂PO₄, (pH 7,0) y 100 µL de la fracción celular requerida (medio extracelular, extracto citoplasmático, membranas o células), obteniendo un total de 360 µL por reacción. Además, se prepararon controles negativos para cada fracción, consistentes en 260 µL del *buffer* fosfato y 100 µL de fracción celular. Por último, se agregó un control negativo para la gliadina, consistente en 75 µL de gliadina y 285 µL de *buffer* 0,1 M KH₂PO₄, (pH 7,0).

Tabla 4: Volúmenes de reacción en microlitros (ul) de cada especie para construir las reacciones enzimáticas y los controles de la digestión. El volumen total de las reacciones equivale a 360 ul.

Especie	Controles					Reacciones			
	Gl	M.E	E.C	Mem.	Cel.	Gl + M.E	Gl + E.C	Gl + Mem	Gl + Cel
Gliadina	75	-	-	-	-	75	75	75	75
Buffer	285	260	260	260	260	185	185	185	185
M.E	-	100	-	-	-	100	-	-	-
E.C	-	-	100	-	-	-	100	-	-
Mem	-	-	-	100	-	-	-	100	-
Células	-	-	-	-	100	-	-	-	100
V. Total	360	360	360	360	360	360	360	360	360

M.E: Medio extracelular, E.C: Extracto citoplasmático, Mem: Membranas, Cel: Células, Gl: Gliadina

Todas las reacciones y controles se construyeron en tubos eppendorf de 600 ul. Al tiempo cero se extrajeron 50 µL de cada tubo y se congelaron a -20°C. Tanto las reacciones como los controles se incubaron a 30°C por 18 horas a 200 rpm. Para poder agitar los tubos, se dispusieron dentro de un vaso precipitado de 250 ml tapado con Parafilm y se aseguró en el *shaker*. Pasadas las 18 horas, se extrajeron 50 µL de cada tubo, se les agregó *buffer* de carga denaturante 5X y se calentaron a 95°C por 5 minutos. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida 12,5% y se corrieron por 90 minutos a 200 V.

4.8 Producción recombinante del péptido inmunogénico 33-mer

El constructo “33-mer fusion” (ver Anexo 4) fue sintetizado y clonado por la compañía Gene Universal en el plasmidio de clonamiento pBluescript SK II. Posteriormente, el constructo se clonó en el plasmidio de expresión pET28a y fue expresado heterológamente en *Escherichia coli*, cepa BL21(DE3), utilizando la plataforma de producción recombinante del laboratorio [95]. El clon fue gentilmente facilitado por Dr.(c) Juan Amado.

Se realizó un preinóculo de la cepa recombinante en 20 ml de medio TB, cuya composición se detalla en el Anexo 3, con marcador de selección, incubado a 25°C y 250 rpm *overnight*. Se inocularon 400 ml de TB con el preinóculo con una OD inicial de 0,05 y se agregó kanamicina a una concentración de 50 ug/ml de cultivo. El cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una OD de 0,6 y se indujo la producción del péptido agregando IPTG hasta alcanzar una concentración de 1mM. 6 horas después de la inducción se centrifugó el cultivo a 5.000 g por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió a 1/10 del volumen de cultivo en *Binding Buffer* 1X.

Se realizó rompimiento celular por ultrasonificación en un programa de 15 pulsos de 10 segundos de duración y 30 segundos de descanso entre cada uno, con una intensidad de 32%. El lisado se centrifugó a 15.000 g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante (proteína soluble) y el pellet se resuspendió en 1/10 del volumen de cultivo con *Buffer* denaturante 1X. El pellet resuspendido se centrifugó a 15.000 g por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante como la fracción de proteína insoluble (cuerpos de inclusión). La proteína insoluble se purificó por cromatografía de afinidad Ni-NTA en FPLC (AKTA)

4.9 Soluciones

Binding Buffer 8X

- Tris Base 320 mM
- NaCl 4 M
- Imidazol 40 mM
- Agua MilliQ

Buffer denaturante 1X 250 ml

- *Binding buffer* 8X 12,5%

- Urea 8 M
- Agua MilliQ

Buffer denaturante de elución

- *Binding buffer* 8X 12,5%
- Urea 8 M
- Imidazol 300 mM
- Agua MilliQ

5 Resultados y discusiones

5.1 Obtención del péptido de alimentación (PPG)

El péptido de alimentación se obtuvo a través de una extracción de gliadina según se menciona en materiales y métodos. Brevemente, el extracto de gliadina se concentró por evaporación a, aproximadamente, 1/4 de su volumen inicial, a 37°C (al menos 24 horas). El concentrado se resuspendió, por goteo, en *buffer* de digestión, se agregaron enzimas tripsina (30 mg/L) y quimotripsina (30 mg/L) y se incubó por 1 hora a 37°C. Finalmente se centrifugó la solución y se conservó el *pellet*.

La razón de que el péptido de alimentación sea un digerido de gliadina surge a raíz de la dificultad que presentó la gliadina al tratar de incorporarla en medios acuosos. Como el medio CDM requiere de una concentración de 3 g/L de fuente de nitrógeno, era necesario concentrar el extracto de gliadina, que contenía cerca de 3 g/L de proteína. Para lograr esto, el extracto se secó a 37°C hasta obtener un sólido (gliadina) que luego se pesó la cantidad requerida para el medio de cultivo y se resuspendió en etanol 70% a 1/50 del volumen inicial del extracto. La gliadina concentrada se resuspendió por goteo en la solución autoclavable del medio CDM (ver Anexo 3). Al ajustar la solución autoclavable a pH 5,4, pasaba de ser turbia, con gliadina en suspensión, a cristalina con grandes cúmulos de gliadina. Por esta razón, se optó por digerir la gliadina, esperando que, al tener péptidos de menor tamaño, pudiese aumentar la solubilidad de los péptidos en medio acuoso.

A diferencia de la gliadina, los PPG lograron ser incorporados a los medios de cultivos sin formar coágulos, incluso a pH bajo 4, que es el pH característico que se observa al final de los cultivos con lactobacilos. Es importante mencionar que se optó trabajar con el *pellet* resultante de la digestión y no con el sobrenadante por las siguientes razones. En primera instancia, al ser la fracción soluble de la digestión, el sobrenadante contiene mayor proporción de aminoácidos libres y péptidos de pequeño tamaño, lo que constituiría una fuente de nitrógeno de fácil obtención para los lactobacilos. Además, al ser insoluble, el *pellet* contiene los péptidos apolares que resistieron la digestión enzimática, es decir, la fracción con alto contenido de prolinas que dificultan la acción de proteasas.

La presencia de aminoácidos libres, di y tri péptidos constituyen una fracción de péptidos que no es detectable por ensayos de cuantificación de proteínas, dificultando la estimación de la concentración de fuente de nitrógeno que se incorporaría al medio. Por lo anterior, se trabajó con el *pellet* y se lo consideró como una sustancia 100% de naturaleza peptídica, lo que puede constituir un error metodológico al poder contener otros elementos de la harina que sean solubles en soluciones alcohólicas al 70%. Sin embargo, los autores de los procesos de extracción de gliadina no mencionan arrastre de componentes no proteicos en la extracción [58], [62]. Además, la mayoría de los lípidos, pigmentos u otros componentes de naturaleza apolar se concentran en el salvado y germen del trigo. Como la harina blanca es en mayor proporción endospermo, la proporción de gliadina debiera ser significativamente mayor que otros componentes contaminantes en el extracto. De todas maneras, la rigurosidad metodológica debiera aplicarse a pesar de cualquier suposición, para aumentar la confianza de los resultados.

5.2 Obtención del consorcio de lactobacilos de la masa madre

Como se explicó en materiales y métodos, se obtuvieron los lactobacilos presentes en la masa madre a partir de un medio de cultivo diseñado para bacterias ácido lácticas (MRS), inoculado directamente con masa madre. Mediante el uso de antimicóticos y cultivos secuenciales, se obtuvo un cultivo de las bacterias que componen la masa madre, libres de las levaduras presentes en dicho consorcio.

Considerando las interacciones ecológicas complejas que caracterizan a la masa madre, es de esperar que la composición de BAL del cultivo final sea distinto a la composición real de bacterias en la masa madre. Como se mencionó en antecedentes, las características ambientales como el tipo de harina, hidratación de la masa, temperatura de fermentación, entre otros, influyen en la composición microbiológica del consorcio. La ausencia de levaduras, el uso de antimicóticos en cultivos secuenciales y el cambio de medio desde harina a MRS constituyen modificaciones ambientales significativas que pudieron haber afectado la composición de microorganismos en el cultivo final, pudiendo haber perdido alguna variedad de interés para este trabajo.

5.3 Selección de lactobacilos según capacidad de alimentarse de péptidos de gliadina

El primer intento de aislar lactobacilos, según su capacidad de digerir péptidos de gliadina (PPG), fue por medio de un cultivo continuo diseñado para usar como presión selectiva el tipo de fuente de nitrógeno que alimentaba el cultivo. El fermentador era alimentado secuencialmente por dos medios idénticos excepto por su fuente de nitrógeno; CDM-Triptona y CDM-PPG, considerando la triptona como una fuente de nitrógeno de más fácil acceso que los PPG.

Alimentando el cultivo con PPG, se esperaba seleccionar los microorganismos capaces de utilizarlos como fuente de nitrógeno, mientras que los que fueran incapaces, serían lavados del fermentador. En ese sentido, a medida que el cultivo acumulara ciclos Triptona-PPG, el cultivo se enriquecería cada vez más de las variedades de lactobacilos de interés, obteniendo finalmente la o las variedades que usen los PPG como fuente de nitrógeno. Además, como consecuencia de la presión selectiva aplicada al cultivo, se esperaba que las variedades finales en el cultivo hayan resultado de procesos adaptativos, mejorando aún más la capacidad proteolítica de estos sobre PPG.

Una vez armado el cultivo, se pudo aplicar 1 ciclo de Triptona-PPG antes de que se observara contaminación en las llaves de paso de medio de cultivo. El material con el que están hechas las llaves no resiste las condiciones del autoclave, por lo que se esterilizó con etanol 70% y luz UV. Pudo no haber sido un tratamiento de esterilización suficiente, como también que dichas llaves no fueran lo suficientemente selladas. Para evitar este problema, convendría reemplazar las llaves por una pinza que estrangule la manguera, disminuyendo la cantidad de conexiones y eliminando las piezas que no se pueden autoclavar.

Si bien corregir los detalles que generaron la contaminación era simple, se decidió aislar los lactobacilos por medio de cultivo en agar, ya que es un método con menor riesgo de contaminación, es más rápido que la evolución artificial y se obtienen colonias separadas en vez de un cultivo que puede estar constituido por varias especies de lactobacilos capaces de alimentarse de PPG. Por último, la presencia de variedades que puedan

hidrolizar PPG, puede beneficiar la presencia de variedades que no lo puedan digerir haciendo que el experimento perdiera su objetivo. Las variedades *non-starters* se aprovechan de los péptidos generados por la proteólisis que realizan las variedades *starters* y pueden desarrollarse en ambientes que no son adecuados para las primeras.

El experimento de selección de lactobacilos, con capacidad proteolítica de PPG, consistió en sembrar colonias (previamente cultivadas en MRS agar) en placas con CDM-PPG agar y aislar las que mostraron crecimiento en dicho medio, según se describe en materiales y métodos.

De las 30 colonias seleccionadas al azar en MRS agar, todas crecieron en las placas CDM-triptona agar, pudiendo distinguir dos tipos de colonias: unas de gris claro con unos 2-3 mm de diámetro, y otras más oscuras con un diámetro cercano a 1 mm. En cuanto al cultivo en CDM-PPG agar se observó una disminución general en el crecimiento e incluso colonias que no se desarrollaron. Las colonias observadas en este último medio eran más homogéneas, presentando un color gris claro y no más de 1 mm en diámetro. De esta manera, se eligieron las 9 colonias que mostraron crecimiento y se cultivaron en medio MRS líquido. Se estableció un stock glicerol de cada una, se rotularon del 1 al 9 y se almacenaron a -80°C.

La disminución del desarrollo de colonias en CDM-PPG agar, se atribuye a dos factores; la dificultad asociada al tamaño de los PPG y la asociada a la alta presencia de prolinas. En el primer caso, solo las bacterias ácido lácticas que expresan proteinasas asociadas a envoltura celular (CEP) podrán usarlos como fuente de nitrógeno, mientras que el resto de las BAL no se desarrollará. Según se menciona en antecedentes, los CEP tienen afinidad por proteínas grandes y apolares, mientras que las variedades que no lo expresan, dependen de oligopéptidos de menos de 20 residuos para incorporarlos al citoplasma y digerirlos con las peptidasas intracelulares. En ese sentido, la selección pudo haber sido según el factor tamaño de péptido y no necesariamente según la dificultad asociada a la composición aminoacídica. Teniendo esto en cuenta, la probabilidad de que las colonias seleccionadas sean los lactobacilos de la masa madre que expresen CEP's es alta. De todas maneras, esto supone un resultado favorable, ya que, las variedades *starters* ejercen una hidrólisis más completa del gluten, en comparación con las *non-starters*.

Si bien se tiene certeza de que dichas colonias crecieron en medio con péptidos de gliadina como única fuente de nitrógeno, no se sabe si las nueve seleccionadas corresponden a una misma variedad de lactobacilo o son las 9 distintas. Sin embargo, lo que se buscó fue obtener una o más colonias que pudiesen generar colonias en un medio con PPG como única fuente de nitrógeno. Para identificar las colonias, se puede lograr de manera confiable mediante una secuenciación del ARNr 16S, sin embargo, constituye un método costoso. Existen, además, kits comerciales especializados en identificación de lactobacilos a nivel de especie API 50 CH (API) o HybriScan (Sigma Aldrich).

Por último, cabe destacar que gracias a la naturaleza definida de CDM, se puede variar el tipo de fuente de nitrógeno independientemente de los otros nutrientes, como ocurriría al utilizar extractos de levadura o carne en medios complejos. Al poder alterar solo dicha variable, resultó ser una buena herramienta para la selección de lactobacilos según su capacidad de hidrolizar fuentes de nitrógeno.

5.4 Capacidad proteolítica de lactobacillus seleccionados con péptidos de gliadina

En un primer intento, la colonia #1 se cultivó en 60 ml de medio MRS y se fraccionaron las células como se mencionó en Materiales y Métodos. El medio extracelular (M.E), extracto citoplasmático (E.C) y las membranas (Mem) fueron utilizadas como fuente de proteasas con el fin de evaluar su capacidad proteolítica sobre gliadina. Las distintas reacciones y los controles fueron preparados como muestra la Tabla 5.

Se tomaron muestras de 50 μ L de las reacciones a tiempo cero y se congelaron junto con los controles. Las reacciones se incubaron a 30°C por 4 horas sin agitación. Pasado el tiempo de incubación se denaturaron las muestras y se corrió un gel de acrilamida como se explicó en materiales y métodos, obteniendo el gel a continuación.

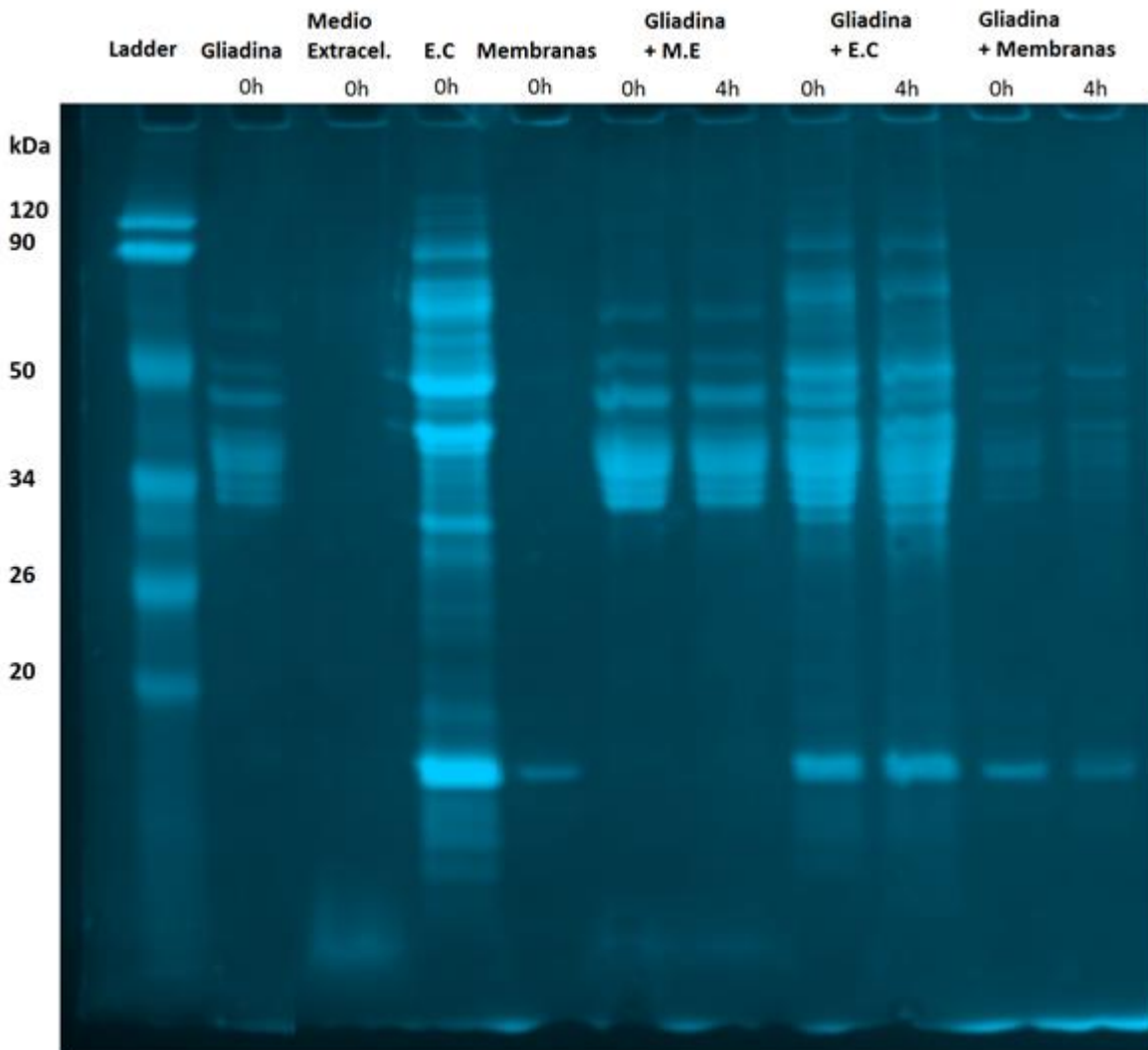


Figura 11: SDS-PAGE de la reacción enzimática del medio extracelular, intracelular y debris celular con gliadina como sustrato. El tiempo total de reacción fue de 4 horas a 30°C. La banda prominente bajo los 20 kDa corresponde a la lisozima utilizada para romper las células. Imagen obtenida por el escaneo del gel en fotodocumentador. M.E: Medio extracelular, E.C: Extracto citoplasmático.

A primera vista no se observaron efectos significativos sobre el sustrato (gliadina), sin embargo, para la reacción con E.C y con membranas, se observó un ligero aumento de intensidad en las bandas cercanas a los 26 kDa, una aparición de bandas de bajo peso molecular al final del carril y una leve disminución de las bandas ubicadas sobre los 34 kDa. El medio extracelular fue el único que no mostró efectos sobre gliadina. Según se observa en el carril correspondiente al medio extracelular, solo se distingue una mancha borrosa de bajo peso molecular (5-10 kDa) asociada a péptidos degradados del mismo medio. Sin embargo, ya que no se ha reportado una significativa actividad proteasa extracelular en lactobacilos, se decidió omitir el uso de medio extracelular para el siguiente ensayo de actividad.

El gel muestra que el extracto de gliadina parece estar puro, pues se pueden identificar claramente los tipos de gliadina (α , β , γ y ω) según lo expone la literatura consultada [97] y, además, carece de bandas extras asociadas a contaminación por arrastre en el proceso de extracción. Cabe mencionar que el volumen de solución de gliadina se estableció según su visibilidad en los geles de acrilamida, lo que equivaldría a unos 0,23 mg de gliadina en los 360 μ L de reacción.

Se repitió el experimento para el extracto citoplasmático y debris celular, aumentando el tiempo de incubación a 18 horas y 37°C, tanto para las reacciones como para los controles. Se descartó el medio extracelular como fuente de proteasas por lo explicado anteriormente y se agregaron células vivas (Cel) como otro agente que pueda hidrolizar la gliadina (GI). Por último, tanto la gliadina como los potenciales agentes de hidrólisis (E.C, membranas y células) se cargaron al tiempo cero y al tiempo final en el gel de acrilamida, de manera de visibilizar los cambios que puedan ocurrir en ellos mismos durante las 18 horas de incubación y así mejorar la resolución de los resultados. Los volúmenes de cada especie se detallan en la siguiente tabla.

De las tres fracciones utilizadas para hidrolizar, el extracto citoplasmático y las células completas evidencian atenuación importante de la gliadina y aparición de bandas nuevas en el gel, siendo las células las que mostraron mayor efecto sobre el sustrato. Los controles respectivos descartan que dichas bandas surjan a causa de la autodegradación de las especies. Para el caso de la digestión con membranas, se obtiene un ruido que dificulta el análisis.

La lisozima utilizada en el protocolo de lisis celular tiende a adherirse a la pared celular y, por ende, a seguir actuando sobre esta mientras las condiciones ambientales lo permitan. Tanto para el ensayo de digestión de gliadina, como para el de lisis celular con lisozima, se utilizó el mismo buffer y pH. De esta manera, la lisozima siguió actuando sobre las células que resistieron el protocolo de sonicación, en el ensayo de digestión con membranas. Esta lisis celular indeseada liberó proteínas intracelulares al medio, obteniendo, finalmente, un patrón de bandas similar al observado en el control de extracto citoplasmático (ver carriles Membrana 0h y 18h, Figura 12). A pesar de lo anterior, se pueden distinguir dos bandas en el segmento entre los 20 y 30 kDa, las cuales no aparecen en sus controles respectivos y que pueden ser a causa de la acción de las proteasas asociadas a la pared celular de las BAL (ver carril Gliadina + Mem. 18h, Figura 12). Cabe destacar que el *pellet* obtenido luego de la lisis celular se lavó 3 veces con el mismo *buffer* fosfato para remover la lisozima, sin embargo, no se observó una disminución de la intensidad de la banda asociada a la lisozima en el gel de proteína (~15 kDa).

Los lactobacilos poseen una gruesa envoltura celular de peptidoglucano que los protege de la acción mecánica del ultrasonido en la sonicación, por lo que se recomienda el uso de lisozima para ayudar a lisarlas. En caso de no usar lisozima, el tiempo de sonificado debiera aumentar significativamente para obtener resultados similares de rompimiento. No obstante, la aplicación de ultrasonido puede disminuir la actividad de las proteasas asociadas a la envoltura celular, por lo que la utilización de membranas celulares como fuente de CEP no parece ser buena opción. En cambio, en caso de querer estudiar la actividad de dichas proteasas, se sugiere lavar los CEP de las células según el protocolo desarrollado por Agyei et. al [98] y utilizarlos como agente hidrolizante. Lo anterior constituye un método más limpio y eficaz que el uso de membranas como fuente de proteasas.

De los controles utilizados, se esperaba observar cambios en el patrón de bandas en todos aquellos que tuvieran presencia de proteasas (i.e. extracto citoplasmático, membranas y células), sin embargo, el control a tiempo final de gliadina mostró una disminución en intensidad y cambios en el patrón de bandas original. Se presume que el extracto de gliadina puede contener proteasas propias de la harina y que al ser resuspendido en medio acuoso se activan y la degradan. Sin embargo, al comparar el patrón de bandas del extracto de gliadina con el obtenido de literatura (ver Antecedentes "2.2.1.1 Gliadinas"), no se observan bandas extras que puedan corresponder a proteasas arrastradas en el proceso de extracción, a menos que dicha banda exista y se solape con las de gliadina.

Teniendo en cuenta lo anterior, una manera de visibilizar mejor los resultados sería denaturar la muestra de gliadina con temperatura. Un programa de 100°C por 5 minutos debiera ayudar a denaturar las proteasas y con eso disminuir el ruido del resultado del ensayo de digestión. En cuanto a la gliadina, al tener puentes disulfuro, la temperatura no debiera afectar la estructura del péptido en gran medida, y en caso de que lo hiciera, habría que modificar las variables del tratamiento térmico. Teniendo este efecto en cuenta, resultaría interesante estudiar la capacidad proteolítica de las proteasas nativas del trigo en torno a la capacidad de degradación del epítipo inmunoreactivo.

Considerando que las células hidrolizaron completamente la gliadina, cuyo peso molecular supera los 28 kDa, es de esperar que pertenezcan a una variedad *starter*. Las proteinasas asociadas a la envoltura celular son las únicas enzimas en las BAL que pueden hidrolizar proteínas de gran tamaño en el medio. Si bien la gliadina sufre una hidrólisis asociada a proteasas del trigo, a las 18 horas de incubación se siguen observando péptidos de tamaño superior a 26 kDa que no podrían ser hidrolizados por BAL *non-starters* únicamente.

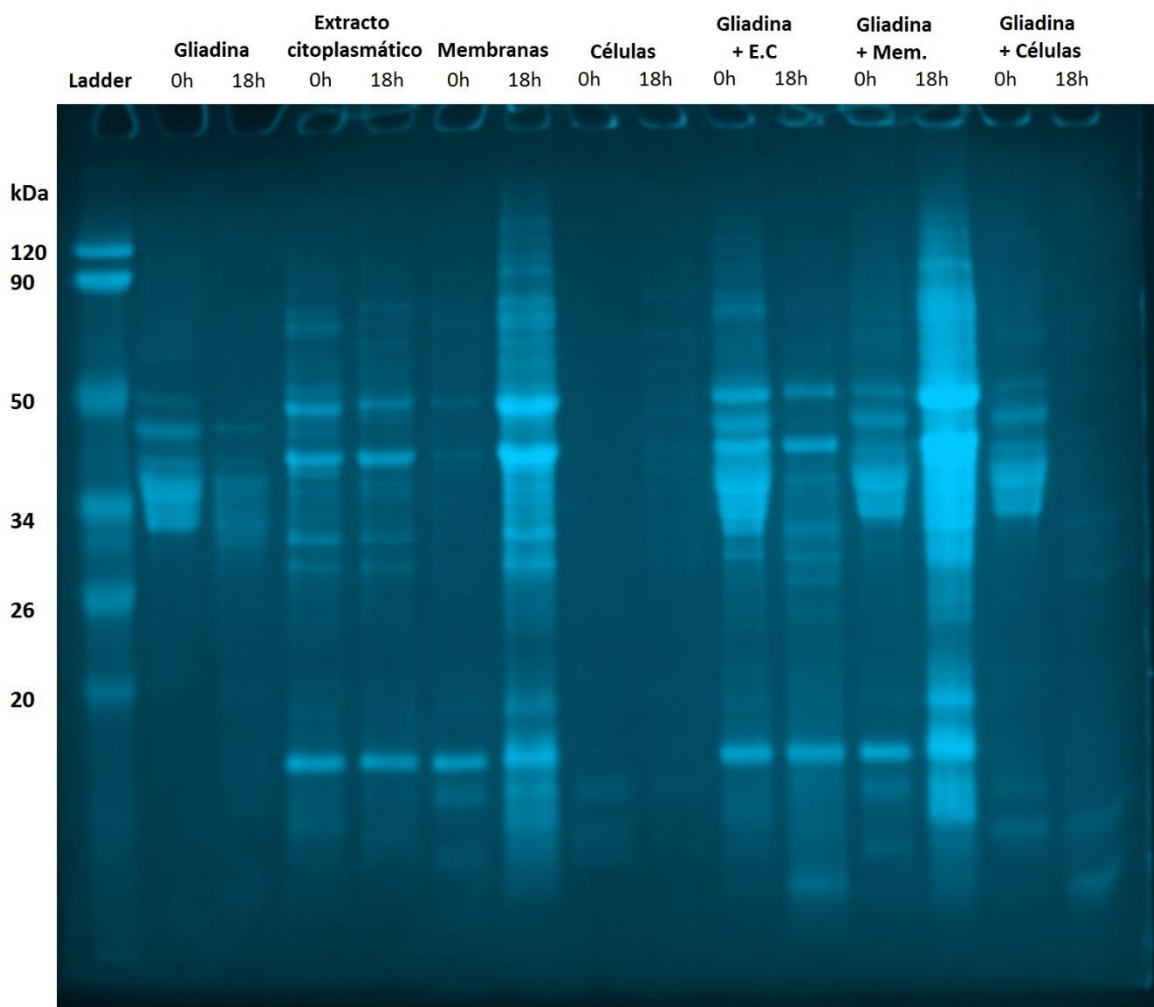


Figura 12: SDS-PAGE de la reacción enzimática de las distintas fracciones celulares con gliadina como sustrato. La banda presente en las fracciones celulares ubicada bajo los 20 kDa es la lisozima utilizada para romper las células. Imagen obtenida por el escaneo del gel en fotodocumentador. E.C: Extracto citoplasmático, Mem: Membranas.

Los PPG corresponden a los péptidos largos e hidrofóbicos que resultaron de la digestión enzimática de la gliadina. Si bien se desconocen los pesos moleculares de estos péptidos, se piensa que en su mayoría son más largos de los que las variedades *non-starters* pueden utilizar como fuente de nitrógeno. Teniendo en cuenta que las nueve colonias seleccionadas mostraron crecimiento en medios con PPG como única fuente de nitrógeno, se cree que todas corresponderían a variedades *starters*. Sin embargo, la capacidad de hidrolizar gliadina puede variar en cada una, por lo que resultaría interesante comparar la capacidad de hidrólisis sobre este sustrato en las nueve colonias. Según los resultados del ensayo de digestión, las células vivas mostraron ser el mecanismo más simple y efectivo para evaluar la capacidad proteolítica total de las bacterias sobre gliadina. De tal manera, se sugiere utilizar solamente las células vivas para evaluar y comparar la capacidad proteolítica de los microorganismos seleccionados, sobre gliadina.

Considerando que una parte de los péptidos generados por la digestión con células corresponden a péptidos pequeños (<8 kDa), el SDS-PAGE al 12% no ofrece una resolución que permita analizarlos adecuadamente. Debido a la característica de los poros del gel, estos péptidos pequeños difunden al final del gel, perdiendo el patrón de bandas que los caracteriza. Los geles de tricina, en cambio, al tener un tamaño de poro menor, son ideales para analizar péptidos menores a 10 kDa, por lo tanto, analizar las muestras de digestión con geles de tricina, junto con el de poliacrilamida al 12%, aumentaría la resolución de los resultados.

5.5 Producción recombinante de péptido inmunogénico 33-mer.

Si bien la gliadina contiene los epítomos inmunogénicos del gluten, que se caracterizan por su resistencia a la acción de las enzimas digestivas, también contiene otros péptidos que son de fácil acceso para dichas enzimas. Para confirmar que efectivamente las proteasas de los lactobacilos seleccionados son capaces de hidrolizar los epítomos, se produjo el fragmento 33-mer de la alfa gliadina de manera recombinante. Este péptido contiene varios epítomos solapados como se mencionó en el marco teórico, por lo que resultó interesante usarlo como sustrato en los ensayos de digestión.

El constructo “33-mer fusion” (ver Anexo 4) fue sintetizado y clonado por la compañía Gene Universal en el plasmidio de clonamiento pBluescript SK II. Posteriormente, el constructo se clonó en el plasmidio de expresión pET28a y fue expresado heterológamente en *Escherichia coli*, cepa BL21(DE3), utilizando la plataforma de producción recombinante del laboratorio [95]. Las células cultivadas se cosecharon y se procesaron para obtener los cuerpos de inclusión, que posteriormente se solubilizaron y se purificaron mediante una cromatografía de afinidad Ni-NTA.

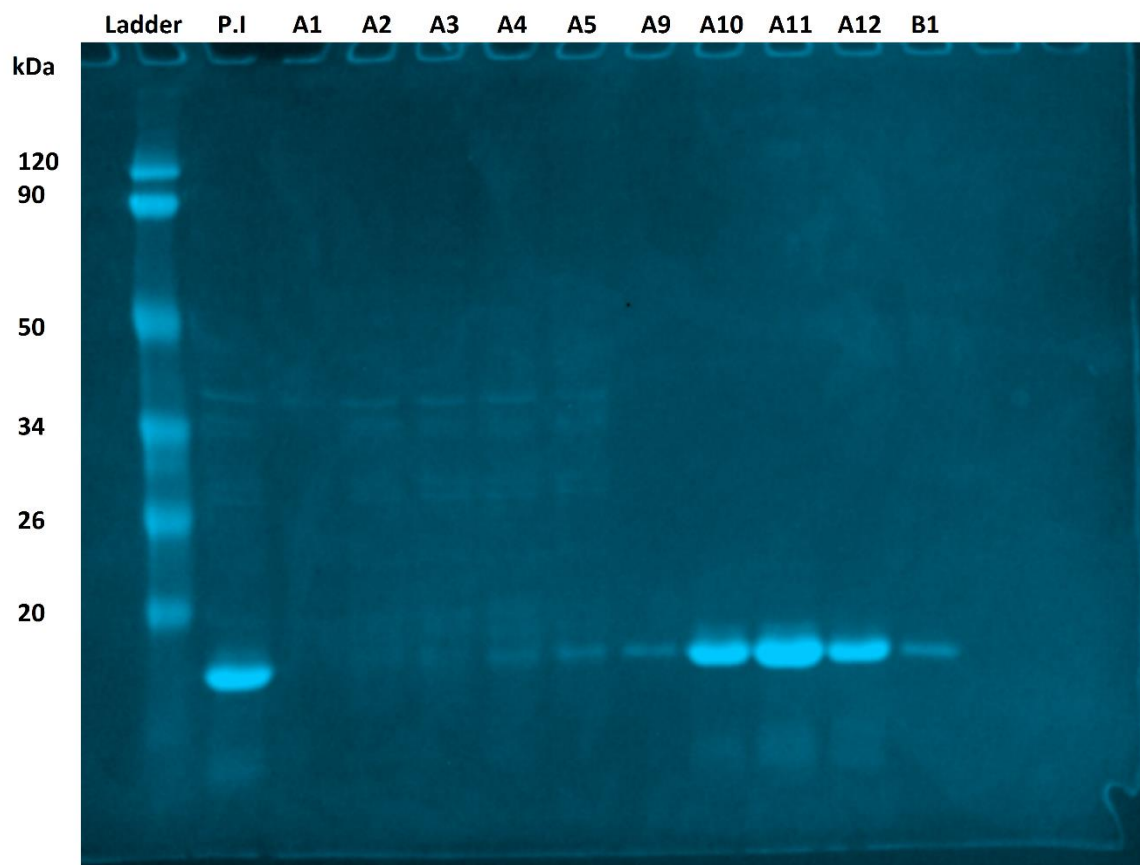


Figura 13: SDS-PAGE de las muestras obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad Ni-NTA del péptido recombinante. El péptido purificado se encuentra entre los carriles A9 y B1. P.I corresponde a la proteína insoluble del cultivo. Imagen obtenida por el escaneo del gel en fotodocumentador.

El resultado de la purificación por cromatografía de afinidad Ni-NTA mostró dos *peaks* relacionados a la presencia de péptidos. El primero, que se observa en los carriles A1 a A5, corresponde a contaminantes de naturaleza peptídica en el extracto de proteína insoluble y el segundo, al péptido completo (carriles A9 a B1), es decir, la cola de histidina, la proteína *carrier* y el 33-mer. La secuencia del péptido que fue sintetizado y, por lo tanto, el que se espera que se haya purificado, es la siguiente:

```

      10      20      30      40      50      60
MHHHHHDET GKELILVLYD YQEKSPRELT IKKGDILTLL NSTNKDWWKV EVNDRQGFFP
      70      80      90      100
AANLKKLDPR DDDDKLQLQP FPQPQLPYQPQ PQLPYQPQL PYQPQPF

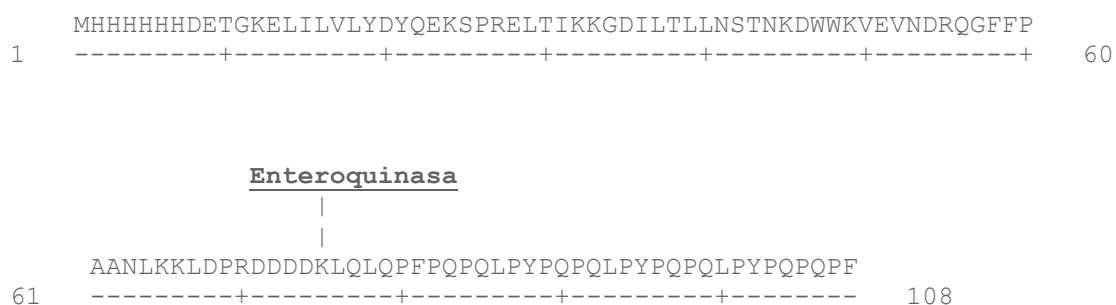
```

En negrita se destaca la secuencia del 33-mer. Según la cantidad y el tipo de aminoácidos, el péptido completo debiera tener un peso aproximado de 13 kDa [99], lo que coincide, aproximadamente, con el peso de la banda correspondiente al péptido

recombinante en el gel de la figura 13 (columnas A9-B1). Es importante notar la presencia de bandas difuminadas de bajo peso molecular en las mismas columnas A9-B1. Dichas columnas representan los péptidos que se adhirieron a la columna de purificación con afinidad a la secuencia de polihistidinas. En ese sentido corresponden a secuencias truncadas que no se alcanzaron a traducir completamente. En particular, dicho fenómeno se atribuye a la alta proporción de prolinas en la secuencia del 33-mer. La prolina es un aminoácido con una estructura cíclica única que disminuye la tasa de formación de enlaces peptídicos por parte del ribosoma. La estructura cíclica evita el posicionamiento de este residuo en el bolsillo de unión de aminoácidos del ribosoma y afecta la posición de la cadena de péptidos nacientes en el túnel ribosómico [100].

Desafortunadamente, debido al cierre de los laboratorios, el 33-mer no alcanzó a purificarse ni utilizarse como sustrato para ensayos de digestión. No obstante, en adelante se indican las directrices para purificarlo.

El péptido fue diseñado para tener un sitio de corte por enteroquinasa al final de la proteína *carrier*, por lo que una digestión con dicha proteasa es suficiente para separar el péptido inmunogénico (~4 kDa) del resto del constructo.



Una vez aplicado el protocolo de digestión con enteroquinasa, bastaría repetir el protocolo de separación por cromatografía de afinidad Ni-NTA. A diferencia del 33-mer y la enteroquinasa, la cola de histidina junto a la proteína *carrier* quedarían adsorbidas a resina de la columna, tanto de los constructos completos como de los truncados. Posteriormente, por medio de un proceso de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa o una cromatografía de exclusión por tamaño, bastaría para separar el 33-mer (~4 kDa) de la enteroquinasa (~30 kDa) presente en la solución.

Una vez se tiene el péptido purificado, lo que restaría sería repetir el ensayo de digestión, utilizando como sustrato el péptido inmunogénico. Considerando el tamaño del 33-mer, los resultados de la digestión debieran ser analizados en geles de tricina, además, resultaría interesante analizar la digestión en una cromatografía. Di Cagno et. al. [31] utilizó un FPLC de fase reversa (RP-FPLC) con una columna PepRPC HR 5/5 y un detector UV a 214 nm para analizar la hidrólisis del 33-mer en ensayos de digestión similares a los que se proponen. Al comparar las curvas características del 33-mer a

tiempo cero y tiempo final de la digestión, se obtienen resultados cuantitativos de la degradación del epítipo.

Si bien no se cumplió el objetivo de este experimento, a continuación, se presentan los resultados de una digestión teórica de la alfa gliadina por acción de las proteasas de variedades *starters* de lactobacilos.

5.6 Hidrólisis teórica de alfa gliadina

A modo de evaluar el potencial proteolítico de las BAL *starters* sobre la alfa gliadina, se llevó a cabo una digestión teórica de este sustrato tomando en cuenta las especificidades generales de las subtilasas, la familia de proteasas a las que pertenecen los CEP.

Considerando la secuencia aminoacídica de la alfa gliadina y la afinidad general de los sitios S1 y S4 de las subtilasas (S1: Y,F>L,M,K>H,A,Q,S, S4: F>L,I,V>A), se identificaron y destacaron las secuencias que, en teoría, son sustratos para dicha proteasa. Las letras en negrita hacen referencia al péptido 33-mer.

MVRVPVPQLQPQNPSQQQPQE**QVPLVQ****QQQFPGQ****QQPF**PPQQPYQPQPFP**SQQP**
YLQLQPF**PQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQ**PF**RPQQPYPQSQPQYSQPQQPI**SQ
QQQQQQQQQQKQQQQQQQQ**ILQQI**LQQQLIPCRDVVL**Q****QHSIA**YGSSQVL**QQSTY**
QLVQQQLCC**QQLWQI**PEQSRCQAIHNVVHAIILHQQQQQQQQQQ**QPLS**QVS**FQQPQ**
QQYPSG**QGSF**QPSQQNPQA**QGSV**QP**QQLPQFEEI**RNLA**LETLPAMCNV**YIP**PYCTI**AP
VGIFGTNYR

Para el caso de los sitios probables de unión que se solapan, se determinó el corte según la jerarquía de afinidades a los residuos en los sitios S1 y S4. Teniendo esto en consideración, se determinaron los péptidos probables que genera la digestión de la alfa gliadina con una subtilasa genérica, como se muestra en la tabla 7.

A primera vista, el péptido 33-mer logra ser escindido en 4 fragmentos (péptidos 5-8), de los cuales solamente el 5, 6 y 7 entrarían al interior de la célula debido a su tamaño. El péptido 8, al contener más de 18 residuos, no puede ser incorporado al medio intracelular por el transportador de oligopéptidos Opp. Es importante destacar que los epítipos presentes en el 33-mer corresponden a PFPQPQLPY, PYPQPQLPY y PYPQPQLPY. Si bien ninguno está completo en los fragmentos 5-8, podrían representar un problema en caso de que la digestión la ejecute una subtilasa con distinta especificidad.

Tabla 5: Péptidos resultantes de la digestión teórica de alfa gliadina con una subtilasa genérica, a modo de simular la acción de los CEP sobre el sustrato.

N° péptido	Péptidos generados	Tamaño (N° residuos)	Transporte por Opp
1)	MVRVPVPQLQPQNPSQQQPQE	21	No
2)	QVPLVQ	6	Si
3)	QQQFPGQ	7	Si
4)	QQPFPPQQPYQPQPFPSQQP	21	No
5)	YLQLQFPF	8	Si
6)	QPQLPYP	7	Si
7)	QPQLPYP	7	Si
8)	QPQLPYPQPQPFPRPQQPYPQSQPQYSQP	28	No
9)	QQPISQQQQQQQQQQQQKQQQQQQQI	27	No
10)	LQQILQQQLIPCRDVVLQ	18	Si
11)	QHSIAYGS	8	Si
12)	SQVLQQST	8	Si
13)	YQLVQQLCCQQ	11	Si
14)	LWQIPEQSRCQAIHNVV	17	Si
15)	HAILHQQQQQQQQQQQQP	19	No
16)	LSQVSFQQPQQQYPSG	16	Si
17)	QGSFQPSQQNPQA	13	Si
18)	QGSVQPQQLPQ	11	Si
19)	FEEIRNLA	8	Si
20)	QGSVQPQQLPQ	11	Si
21)	FEEIRNLA	8	Si
22)	LETLPA	6	Si
23)	MCNVYIPP	8	Si
24)	YCTIAPVGIFGTNYR	15	Si

En ese sentido, el rol que debiera esperarse de los cortes producidos por los CEP es que corte la alfa gliadina de manera tal que todo el 33-mer pueda entrar a las células y ser completamente digerido por las peptidasas intracelulares. Teniendo eso en cuenta, la opción más eficaz para eliminar los epítomos inmunoreactivos de la gliadina sería someter el sustrato a más de una BAL *starter*. Como cada CEP tiene afinidad por distintos sitios de corte, complementar la acción de cada proteinasa permitiría generar péptidos de tamaño suficiente para ser transportados al citoplasma celular. De ser así, las bacterias ácido lácticas seleccionadas constituirían una herramienta innovadora y eficaz, con aplicaciones en el área de la industria alimentaria en la confección de productos aptos para celíacos, elaborados con materias primas que contienen gluten.

6 Conclusiones

A grandes rasgos, se cumplió el objetivo principal de la tesis, pudiendo seleccionar lactobacilos desde masa madre según su capacidad de utilizar péptidos ricos en prolina y glutamina como única fuente de nitrógeno y evaluar su capacidad de hidrolizar péptidos de gliadina.

Los ensayos de digestión demostraron una hidrólisis casi completa de la gliadina por las bacterias de la colonia #1, sin embargo, la digestión con las 8 colonias restantes no se alcanzó a realizar. Si bien no se evaluó empíricamente la digestión del 33-mer por las colonias, un análisis de hidrólisis teórico sustenta la eficacia de estas bacterias en la digestión de los epítomos del gluten. Estos resultados confirman la hipótesis que bacterias ácido lácticas presentes en la masa madre constituyen una herramienta eficaz para la producción de alimentos aptos para el consumo por celíacos a partir de materias primas que contienen gluten.

Los próximos desafíos consisten en evaluar la capacidad proteolítica de estas BAL en fermentaciones con harina y determinar tanto los parámetros de fermentación como la colonia -o combinación de ellas- que entreguen la degradación más completa de los epítomos del gluten. Disminuir la afinidad del represor transcripcional CodY la caja CodY, en las cepas seleccionadas, puede constituir una optimización de la proteólisis. Disminuir la represión del sistema proteolítico de los microorganismos podría disminuir significativamente los tiempos de fermentación requeridos para hidrolizar completamente los epítomos.

7 Bibliografía

- [1] R. J. Presutti, J. R. Cangemi, H. D. Cassidy, and D. A. Hill, "Celiac disease," *Am. Fam. Physician*, vol. 76, no. 12, pp. 1795–1802, 2007, [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18217518>.
- [2] N. Gujral, H. J. Freeman, and A. B. R. Thomson, "Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, no. 42, pp. 6036–59, Nov. 2012, doi: 10.3748/wjg.v18.i42.6036.
- [3] J. West *et al.*, "Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England.," *Gut*, vol. 52, no. 7, pp. 960–5, Jul. 2003, doi: 10.1136/GUT.52.7.960.
- [4] J. S. Trier, "Celiac Sprue," *N. Engl. J. Med.*, vol. 325, no. 24, pp. 1709–1719, Dec. 1991, doi: 10.1056/NEJM199112123252406.
- [5] Walker-Smith, "Revised criteria for diagnosis of coeliac disease," pp. 909–911, 1990.
- [6] S. K. Lee and P. H. R. Green, "Endoscopy in celiac disease.," *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 5, pp. 589–94, Sep. 2005, Accessed: Jun. 19, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093775>.
- [7] O. Molberg *et al.*, "Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease.," *Nat. Med.*, vol. 4, no. 6, pp. 713–7, Jun. 1998, Accessed: Apr. 14, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9623982>.
- [8] L. M. Sollid, "Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 9, pp. 647–655, Sep. 2002, doi: 10.1038/nri885.
- [9] C. Khosla *et al.*, "Identification and Analysis of Multivalent Proteolytically Resistant Peptides from Gluten: Implications for Celiac Sprue," *J. Proteome Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 1732–1741, 2005, doi: 10.1021/pr050173t.
- [10] H. Arentz-Hansen *et al.*, "The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 4, pp. 603–12, Feb. 2000, Accessed: Apr. 14, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10684852>.
- [11] "Histocompatibility complex - Genetics Home Reference - NIH." <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genefamily/hla> (accessed Apr. 08, 2019).
- [12] S. Abbs, T. Bussoli, and F. Kavalier, "Nature Encyclopaedia of the Human Genome," *Bmj*, vol. 328, no. 7432, p. 172, 2004, doi: 10.1136/bmj.328.7432.172.
- [13] T. Shiina, H. Inoko, and J. K. Kulski, "An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004.," *Tissue Antigens*, vol. 64, no. 6, pp. 631–49, Dec. 2004, doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00327.x.
- [14] M. Griffin, R. Casadio, and C. M. Bergamini, "Transglutaminases : Nature ' s biological glues," vol. 396, pp. 377–396, 2002.

- [15] M.-J. Im, M. A. Russell, and J.-F. Feng, "Transglutaminase II: A New Class of GTP-Binding Protein with New Biological Functions," *Cell. Signal.*, vol. 9, no. 7, pp. 477–482, Nov. 1997, doi: 10.1016/S0898-6568(97)00049-1.
- [16] M. Lesort, K. Attanavanich, J. Zhang, and G. V Johnson, "Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 20, pp. 11991–4, May 1998, Accessed: Apr. 12, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9575137>.
- [17] D. Aeschlimann and V. Thomazy, "Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases.," *Connect. Tissue Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–27, 2000, Accessed: Apr. 12, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10826705>.
- [18] S. S. Akimov and A. M. Belkin, "Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin.," *Blood*, vol. 98, no. 5, pp. 1567–76, Sep. 2001, Accessed: Apr. 13, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520809>.
- [19] Q. Ruan and G. V. W. Johnson, "Transglutaminase 2 in neurodegenerative disorders.," *Front. Biosci.*, vol. 12, pp. 891–904, Jan. 2007, Accessed: Apr. 14, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127346>.
- [20] S. Y. Kim, T. M. Jeitner, and P. M. Steinert, "Transglutaminases in disease.," *Neurochem. Int.*, vol. 40, no. 1, pp. 85–103, Jan. 2002, Accessed: Apr. 14, 2019. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738475>.
- [21] O. Molberg, "Role of Tissue Transglutaminase in Celiac Disease: Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition," Accessed: Apr. 14, 2019. [Online]. Available: https://journals.lww.com/jpgn/fulltext/2000/03000/role_of_tissue_transglutaminase_in_celiac_disease.5.aspx.
- [22] P. R. Shewry, A. S. Tatham, and N. G. Halford, "The Prolamins of the Triticeae," *Seed Proteins*, pp. 35–78, 2012, doi: 10.1007/978-94-011-4431-5_3.
- [23] P. R. Shewry, N. G. Halford, A. S. Tatham, Y. Popineau, D. Lafiandra, and P. S. Belton, *The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties.*, vol. 45. 2003.
- [24] H. Wieser, "Chemistry of gluten proteins," *Food Microbiol.*, vol. 24, no. 2, pp. 115–119, 2007, doi: 10.1016/j.fm.2006.07.004.
- [25] A. S. Tatham and P. R. Shewry, "The Conformation of Wheat Gluten Proteins . The Secondary Structures and Thermal Stabilities of α - , \sim - , γ - and co-Gliadins," *J. Cereal Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 103–113, 1985, doi: 10.1016/S0733-5210(85)80021-7.
- [26] W. Grosch and H. Wieser, "Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid," vol. 29, pp. 1–16, 1999.
- [27] L. Rooke *et al.*, "Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength," *J. Cereal Sci.*, vol. 30, no. 2, pp. 115–120, 1999,

doi: 10.1006/jcrs.1999.0265.

- [28] R. E. and G. L. C. Guthrie, "Disulphide Bonds in Gluten Proteins," vol. 25, pp. 238–240, 1997.
- [29] D. J. Barlow and J. M. Thornton, "Helix geometry in proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 201, no. 3, pp. 601–619, Jun. 1988, doi: 10.1016/0022-2836(88)90641-9.
- [30] H. Matsubara, A. Singer, and R. M. Sasaki, "Effect of proline residue on the hydrolysis of substrates by thermolysin," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 34, no. 5, pp. 719–724, Mar. 1969, doi: 10.1016/0006-291X(69)90798-0.
- [31] S. Auricchio *et al.*, "Sourdough Bread Made from Wheat and Nontoxic Flours and Started with Selected Lactobacilli Is Tolerated in Celiac Sprue Patients," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 1088–1096, 2004, doi: 10.1128/aem.70.2.1088-1096.2004.
- [32] S.-W. Qiao, E. Bergseng, Ø. Molberg, G. Jung, B. Fleckenstein, and L. M. Sollid, "Refining the Rules of Gliadin T Cell Epitope Binding to the Disease-Associated DQ2 Molecule in Celiac Disease: Importance of Proline Spacing and Glutamine Deamidation," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 1, pp. 254–261, Jul. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.1.254.
- [33] K. Schalk, C. Lang, H. Wieser, P. Koehler, and K. A. Scherf, "Quantitation of the immunodominant 33-mer peptide from α -gliadin in wheat flours by liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 45092, Apr. 2017, doi: 10.1038/srep45092.
- [34] W. P. Hammes and M. G. Gänzle, "Sourdough breads and related products," in *Microbiology of Fermented Foods*, Boston, MA: Springer US, 1998, pp. 199–216.
- [35] P. Decock and S. Cappelle, "Bread technology and sourdough technology," vol. 16, pp. 113–120, 2005, doi: 10.1016/j.tifs.2004.04.012.
- [36] "Sourdough Science | Modernist Cuisine." <https://modernistcuisine.com/2018/09/sourdough-science/> (accessed May 05, 2020).
- [37] K. Poutanen, L. Flander, and K. Katina, "Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective," *Food Microbiol.*, vol. 26, no. 7, pp. 693–699, 2009, doi: 10.1016/j.fm.2009.07.011.
- [38] E. Arendt and F. Dal Bello, *Gluten-free cereal products and beverages*. Elsevier/Academic Press, 2008.
- [39] W. P. Hammes and R. F. Vogel, "The genus *Lactobacillus*," in *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Boston, MA: Springer US, 1995, pp. 19–54.
- [40] Springer, "Lactic Acid Bacteria," 2002.
- [41] A. Corsetti, L. Settanni, A. Corsetti, and L. Settanni, "Lactobacilli in sourdough fermentation Lactobacilli in sourdough fermentation," no. September, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2006.11.001.
- [42] G. Gottschalk, *Bacterial Metabolism*. Springer New York, 1986.

- [43] L. De Vuyst and P. Neysens, "The sourdough microflora : biodiversity and metabolic interactions," vol. 16, pp. 43–56, 2005, doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.012.
- [44] M. Gobbetti, A. Corsetti, J. (Perugia U. (Italy). I. di M. e M. L. C. Rossi, F. la (Perugia U. (Italy). D. di I. Rosa, and S. de (Perugia U. (Italy). I. di Z. G. Vincenzi, "Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy," *Ital. J. Food Sci.*, 1994, Accessed: Mar. 28, 2019. [Online]. Available: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT9462370>.
- [45] M. Gobbetti, "The sourdough microflora : Interactions of lactic acid bacteria and yeasts," vol. 9, 1998.
- [46] "Handbook of Food Spoilage Yeasts - Tibor Deak - Google Libros." [https://books.google.cl/books?id=RR21g8_2OXIC&pg=PA197&lpg=PA197&dq=S+PICHER,+G.+Baked+Goods.+In:+REHM,+H.+J.+AND+REED,+G.+\(Eds\),+Biotechnology,+Vol.+5.+Weinheim:+Verlag+Chemie,+pp.+1-80+\(1983\)&source=bl&ots=fZe3-oje5G&sig=ACfU3U0Vp9QmrgptXWlukPLaN](https://books.google.cl/books?id=RR21g8_2OXIC&pg=PA197&lpg=PA197&dq=S+PICHER,+G.+Baked+Goods.+In:+REHM,+H.+J.+AND+REED,+G.+(Eds),+Biotechnology,+Vol.+5.+Weinheim:+Verlag+Chemie,+pp.+1-80+(1983)&source=bl&ots=fZe3-oje5G&sig=ACfU3U0Vp9QmrgptXWlukPLaN) (accessed Sep. 28, 2019).
- [47] M. GOBBETTI, M. S. SIMONETTI, J. ROSSI, L. COSSIGNANI, A. CORSETTI, and P. DAMIANI, "Free D- and L-Amino Acid Evolution During Sourdough Fermentation and Baking," *J. Food Sci.*, vol. 59, no. 4, pp. 881–884, Jul. 1994, doi: 10.1111/j.1365-2621.1994.tb08149.x.
- [48] P. Damiani, M. Gobbetti, L. Cossignani, A. Corsetti, M. S. Simonetti, and J. Rossi, "The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 29, no. 1–2, pp. 63–70, Jan. 1996, doi: 10.1006/FSTL.1996.0009.
- [49] E. M. Hébert, R. R. Raya, and G. Savoy de Giori, "Modulation of the cell-surface proteinase activity of thermophilic lactobacilli by the peptide supply," *Curr. Microbiol.*, vol. 45, no. 6, pp. 385–389, Dec. 2002, doi: 10.1007/s00284-002-3780-z.
- [50] E. R. S. Kunji, "The proteolytic systems of lactic acid bacteria," *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, vol. 70, no. 2–4. Springer, pp. 187–221, 1996, doi: 10.1007/BF00395933.
- [51] A. Hansen and P. Schieberle, "Generation of aroma compounds during sourdough fermentation : applied and fundamental aspects," vol. 16, pp. 85–94, 2005, doi: 10.1016/j.tifs.2004.03.007.
- [52] H. Meisel and W. Bockelmann, "Bioactive peptides encrypted in milk proteins: Proteolytic activation and thropho-functional properties," in *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1999, vol. 76, no. 1–4, pp. 207–215, doi: 10.1023/A:1002063805780.
- [53] M. Gobbetti, L. Stepaniak, M. De Angelis, A. Corsetti, and R. Di Cagno, "Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 42, no. 3, pp. 223–239, 2002, doi:

10.1080/10408690290825538.

- [54] K. Savijoki, H. Ingmer, and P. Varmanen, "Proteolytic systems of lactic acid bacteria," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 71, no. 4, pp. 394–406, 2006, doi: 10.1007/s00253-006-0427-1.
- [55] J. E. Christensen, E. G. Dudley, J. A. Pederson, and J. L. Steele, "Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria," in *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1999, vol. 76, no. 1–4, pp. 217–246, doi: 10.1023/A:1002001919720.
- [56] D. Stefanitsi, G. Sakellaris, and J. Garel, "The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 128, no. 1, pp. 53–58, Apr. 1995, doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07499.x.
- [57] M. Miyamoto *et al.*, "Distinctive proteolytic activity of cell envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* isolated from airag, a traditional Mongolian fermented mare's milk," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 197, pp. 65–71, 2015, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.012.
- [58] Y. Guo, D. Pan, X. Zeng, and M. Tanokura, "Purification and characterization of CEP from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*," *Food Chem.*, vol. 112, no. 3, pp. 533–538, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.002.
- [59] M. Genay, L. Sadat, V. Gagnaire, and S. Lortal, "Prth2, Not prth, Is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 10, pp. 3238–3249, May 2009, doi: 10.1128/AEM.02395-08.
- [60] M. D. Fernandez-Espla, P. Garault, V. Monnet, and F. Rul, "Streptococcus thermophilus cell wall-anchored proteinase: Release, purification, and biochemical and genetic characterization," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 11, pp. 4772–4778, Nov. 2000, doi: 10.1128/AEM.66.11.4772-4778.2000.
- [61] R. J. Siezen, "Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria," in *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Springer Netherlands, 1999, pp. 139–155.
- [62] H. E. Swaisgood, "Chemistry of the Caseins," in *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, Springer US, 2003, pp. 139–201.
- [63] P. F. Fox, "Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening," *J. Dairy Sci.*, vol. 72, no. 6, pp. 1379–1400, Jun. 1989, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8.
- [64] C. F. Higgins, "ABC TRANSPORTERS: From Microorganisms to Man," 1992. Accessed: Jun. 05, 2020. [Online]. Available: www.annualreviews.org.
- [65] F. J. M. Detmers, E. R. S. Kunji, F. C. Lanfermeijer, B. Poolman, and W. N. Konings, "Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*," *Biochemistry*, vol. 37, no. 47, pp. 16671–16679, Nov. 1998, doi: 10.1021/bi981712t.
- [66] F. J. M. Detmers, E. R. S. Kunji, F. C. Lanfermeijer, B. Poolman, and W. N. Konings, "Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*," *Biochemistry*, vol. 37, no. 47, pp. 16671–16679, Nov. 1998, doi:

10.1021/bi981712t.

- [67] A. Hagting, E. R. S. Kunji, K. J. Leenhouts, B. Poolman, and W. N. Konings, "The Di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 15, pp. 11391–11399, 1994.
- [68] C. Foucaud *et al.*, "Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 16, pp. 4652–4657, Aug. 1995, doi: 10.1128/jb.177.16.4652-4657.1995.
- [69] Y. Sanz, F. Toldrà, P. Renault, and B. Poolman, "Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 227, no. 1, pp. 33–38, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00662-1.
- [70] K. M. Fenster, K. L. Parkin, and J. L. Steele, "Characterization of a thiol-dependent endopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32," *J. Bacteriol.*, vol. 179, no. 8, pp. 2529–2533, Apr. 1997, doi: 10.1128/jb.179.8.2529-2533.1997.
- [71] V. Juillard, H. Laan, E. R. S. Kunji, C. M. Jeronimus-Stratingh, A. P. Bruins, and W. N. Konings, "The extracellular P(I)-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 12, pp. 3472–3478, Jun. 1995, doi: 10.1128/jb.177.12.3472-3478.1995.
- [72] J. D. Marugg, W. Meijer, R. Van Kranenburg, P. Laverman, P. G. Bruinenberg, and W. M. De Vos, "Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: Control of transcription initiation by specific dipeptides," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 11, pp. 2982–2989, Jun. 1995, doi: 10.1128/jb.177.11.2982-2989.1995.
- [73] E. Guédon, P. Serror, S. D. Ehrlich, P. Renault, and C. Delorme, "Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*," *Mol. Microbiol.*, vol. 40, no. 5, pp. 1227–1239, 2001, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02470.x.
- [74] E. Guédon, P. Renault, S. Dusko Ehrlich, and C. Delorme, "Transcriptional Pattern of Genes Coding for the Proteolytic System of *Lactococcus lactis* and Evidence for Coordinated Regulation of Key Enzymes by Peptide Supply," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 12, pp. 3614–3622, 2001, doi: 10.1128/JB.183.12.3614-3622.2001.
- [75] C. D. Den Hengst, S. A. F. T. Van Hijum, J. M. W. Geurts, A. Nauta, J. Kok, and O. P. Kuipers, "The *Lactococcus lactis* CodY Regulon IDENTIFICATION OF A CONSERVED cis-REGULATORY ELEMENT * □ S," *ASBMB*, 2005, doi: 10.1074/jbc.M502349200.
- [76] C. D. Den Hengst *et al.*, "Probing Direct Interactions between CodY and the oppD Promoter of *Lactococcus lactis* Downloaded from," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 2, pp. 512–521, 2005, doi: 10.1128/JB.187.2.512-521.2005.
- [77] N. Vermeulen, M. Pavlovic, M. A. Ehrmann, M. G. Ga, and R. F. Vogel, "Functional Characterization of the Proteolytic System of," *Society*, vol. 71, no. 10, pp. 6260–6266, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.10.6260.

- [78] M. K. Doeven, J. Kok, and B. Poolman, "Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms," *Mol. Microbiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 640–649, Jun. 2005, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04698.x.
- [79] R. J. Siezen and J. A. M. Leunissen, "Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases," *Protein Sci.*, vol. 6, no. 3, pp. 501–523, 2008, doi: 10.1002/pro.5560060301.
- [80] "MEROPS - the Peptidase Database." <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=S8> (accessed Aug. 12, 2020).
- [81] "prtB - Proteinase precursor - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - prtB gene & protein." <https://www.uniprot.org/uniprot/Q48545> (accessed Jul. 30, 2020).
- [82] J. J. Perona and C. S. Craik, "Structural basis of substrate specificity in the serine proteases," *Protein Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 337–360, 1995, doi: 10.1002/pro.5560040301.
- [83] R. Siezen, J. Leunissen, ... U. S. and protein folding. R. L., and undefined 1995, "Homology analysis of the propeptides of subtilisin-like serine proteases (subtilases)."
- [84] I. Schechter and A. Berger, "On the size of the active site in proteases. I. Papain," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 27, no. 2, pp. 157–162, Apr. 1967, doi: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X.
- [85] W. Bleukx, J. D.-J. of C. Science, and undefined 2000, "A second aspartic proteinase associated with wheat gluten," *Elsevier*, Accessed: Jun. 16, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073352100090300X>.
- [86] W. Bleukx, K. Brijs, S. Torrekens, ... F. V. L.-... et B. A. (BBA, and undefined 1998, "Specificity of a wheat gluten aspartic proteinase," *Elsevier*, Accessed: Jun. 16, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483898001460>.
- [87] O. Pepe, F. Villani, D. Oliviero, T. Greco, and S. Coppola, "Effect of proteolytic starter cultures as leavening agents of pizza dough," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 84, no. 3, pp. 319–326, 2003, doi: 10.1016/S0168-1605(02)00473-7.
- [88] L. Shan, F. Filiz, G. M. Gray, and L. M. Sollid, "Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue," vol. 2275, no. 2002, 2012, doi: 10.1126/science.1074129.
- [89] M. Gobbetti, E. Pontonio, P. Filannino, C. G. Rizzello, M. De Angelis, and R. Di Cagno, "How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food science perspective," *Food Res. Int.*, vol. 110, pp. 22–32, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2017.04.010.
- [90] A. Vera, V. Rigobello, and Y. Demarigny, "Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli," *Food Microbiol.*, vol. 26, no. 7, pp. 728–733, 2009, doi: 10.1016/j.fm.2009.07.010.
- [91] A. Wegkamp, B. Teusink, W. M. De Vos, and E. J. Smid, "Development of a minimal

- growth medium for *Lactobacillus plantarum*,” vol. 50, no. Bringel 1998, pp. 57–64, 2010, doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02752.x.
- [92] W. Weiss, C. Vogelmeier, and A. Gorg, “Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different,” *Electrophoresis*, vol. 14, no. 8, pp. 805–816, 1993.
- [93] B. Teusink, A. Wegkamp, E. J. Smid, and R. J. Siezen, “In Silico Reconstruction of the Metabolic Pathways of,” *Society*, vol. 71, no. 11, pp. 7253–7262, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.11.7253.
- [94] F. Z. Hegazi and I. G. Abo-Elnaga, “Proteolytic activity of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*,” *Food / Nahrung*, vol. 31, no. 3, pp. 225–232, 1987, doi: 10.1002/food.19870310309.
- [95] V. R. GALLARDO, “DISEÑO DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO,” 2013.
- [96] A. S. Tatham, S. M. Gilbert, R. J. Fido, and P. R. Shewry, “Extraction, Separation, and Purification of Wheat Gluten Proteins and Related Proteins of Barley, Rye, and Oats,” vol. 41.
- [97] M. Nadeem *et al.*, “Electrophoretic Characteristics of Gluten Proteins as Influenced by Crop Year and Variety,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 19, no. 4, pp. 897–910, 2016, doi: 10.1080/10942912.2015.1045518.
- [98] D. Agyei and L. He, “Evaluation of cross-linked enzyme aggregates of *Lactobacillus cell-envelope* proteinases, for protein degradation,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 94, pp. 59–69, 2015, doi: 10.1016/j.fbp.2015.01.004.
- [99] “ExpASy: get pI/Mw.” https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool (accessed Jul. 15, 2020).
- [100] S. Melnikov *et al.*, “Molecular insights into protein synthesis with proline residues,” *EMBO Rep.*, vol. 17, no. 12, pp. 1776–1784, Dec. 2016, doi: 10.15252/embr.201642943.
- [101] “Alpha-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).” <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9M4L6> (accessed Nov. 09, 2019).
- [102] “Gamma-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).” <https://www.uniprot.org/uniprot/P04730> (accessed Nov. 09, 2019).
- [103] “Omega-gliadin - Triticum aestivum (Wheat).” <https://www.uniprot.org/uniprot/U5U7B7> (accessed Nov. 09, 2019).
- [104] “Alpha/beta-gliadin MM1 precursor - Triticum aestivum (Wheat).” <https://www.uniprot.org/uniprot/P18573> (accessed Nov. 09, 2019).
- [105] “Terrific Broth - OpenWetWare.” https://openwetware.org/wiki/Terrific_Broth (accessed May 05, 2020).

8 Anexos

8.1 Anexo 1: Secuencia aminoacídica de la gliadina

A continuación, se presentan las secuencias, punto isoeléctrico de los tipos de gliadina y de los epítomos presentes en cada una, destacados en naranja.

8.1.1 Alfa gliadina (290 aa - 33.7 kDa) [101]

MVRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQFPGQQQPFPPQQPYQPQPFFPSQQP
Y**LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFR**RPQQPYPQSQPQYSQPQQPISQ
QQQQQQQQQQKQQQQQQQQILQQILQQQLIPCRDVVLQQHSIAYGSSQVLQQSTY
QLVQQQLCCQQLWQIPEQSRCAIHNVVHAILHQQQQQQQQQQPLSQVVSFQQPQ
QQYPSGQGSFQPSQQNPQAQGSVQPQQLPQFEEIRNLALETLPAMCNVYIPPYCTIAP
VGIFGTNYR

p.I: 7.61

p.I 33-mer: 5.52

MW 33mer: 3.9 kDa

8.1.2 Gamma gliadina (251 aa - 29 kDa) [102]

MKTLILLITILAMAITIGTANMQVDPSSQVQWPQQQVPQPHQPFSQQPQQTFFPQPQQT
FPHQPQQQFPQPQQPQQQ**FLQPQQFPQQPQQPYQPQPQQPFPQ**TQQPQQLFPSQ
QQPQQQFSQPQQQFPQPQQPQQSFPQQQPPFIQPSLQQQVNPCKNLLQQCKPVS
VSSLWSMIWPQSDCQVMRQQCCQQLAQIPQQLQCAAIHTIIHSIIMQQEQQEQQQGM
HILLPLYQQQQVGGGTLVQGGGIIQ

p.I: 6.93

p.I 26-mer: 5.52

MW 26-mer: 3.15 kDa

8.1.3 Omega gliadina (354 aa - 38.4 kDa) [103]

MKPHHDGYKYTCIIIVTFHYPNFKHQDQKHQFQESIKHKSMMKTFIIFVLLSMPMSIVIAA
RHLNPSDQELQSPQQQFLEKTIISAATISTSTIFTTTTISHPTIFPPSTTTTISPTPTTNP
TTTMTIPLATPTTTTTFSPAPTTISLATTTTISLAPTTNSPITTTTIPAATPETTTTTIPPATRT
NNYASTATTISLLTATTTTPATPTTILSATTTTISPAPTIISPATRTNNSLATPTTIPPATATTI
PPATRTNNSPATATTIPPAPQQRFPHTRQKFPRNPNNHSLCSTHHFPAQQPFPQQPG
QIIPQQPQQPLPLQPQQPFPWQPEQRSSQQPQQPFSLQPQQPFS

p.I: 10.1

8.1.4 Alfa-beta gliadina (307 aa - 35.3 kDa) [104]

MKTFLILALLAIVATTARIAVRVPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQFPGQQQPFPP
PQQPYQPQPFFPSQQPY**LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPFR**RPQQPY
PQSQPQYSQPQQPISQQQQQQQQQQKQQQQQQQQILQQILQQQLIPCRDVVLQQ
HSIAYGSSQVLQQSTYQLVQQQLCCQQLWQIPEQSRCAIHNVVHAILHQQQQQQQQ
QQQQPLSQVVSFQQPQQQYPSGQGSFQPSQQNPQAQGSVQPQQLPQFEEIRNLALET
LPAMCNVYIPPYCTIAPVGIFGTN

p.I: 8.22

p.I 33-mer: 5.52

MW 33mer: 3.9 kDa

8.2 Anexo 2: Determinación de concentración de gliadina en solución alcohólica al 70% en ensayo de Bradford

La presencia de etanol en la solución de gliadina interfiere con el azul de Coomassie haciendo que los resultados obtenidos en este ensayo sean erráticos. Sin embargo, se encontró que, desde cierta dilución de esta solución, el ensayo se volvía un poco más confiable.

Para esto, se realizó un ensayo de Bradford para distintas diluciones de la solución de gliadina en sextuplicado. Se graficó la curva obtenida por los datos de absorbancia y se determinó que diluciones sobre 1 en 7 reflejan un comportamiento lineal, adecuado para medir concentración de proteínas.

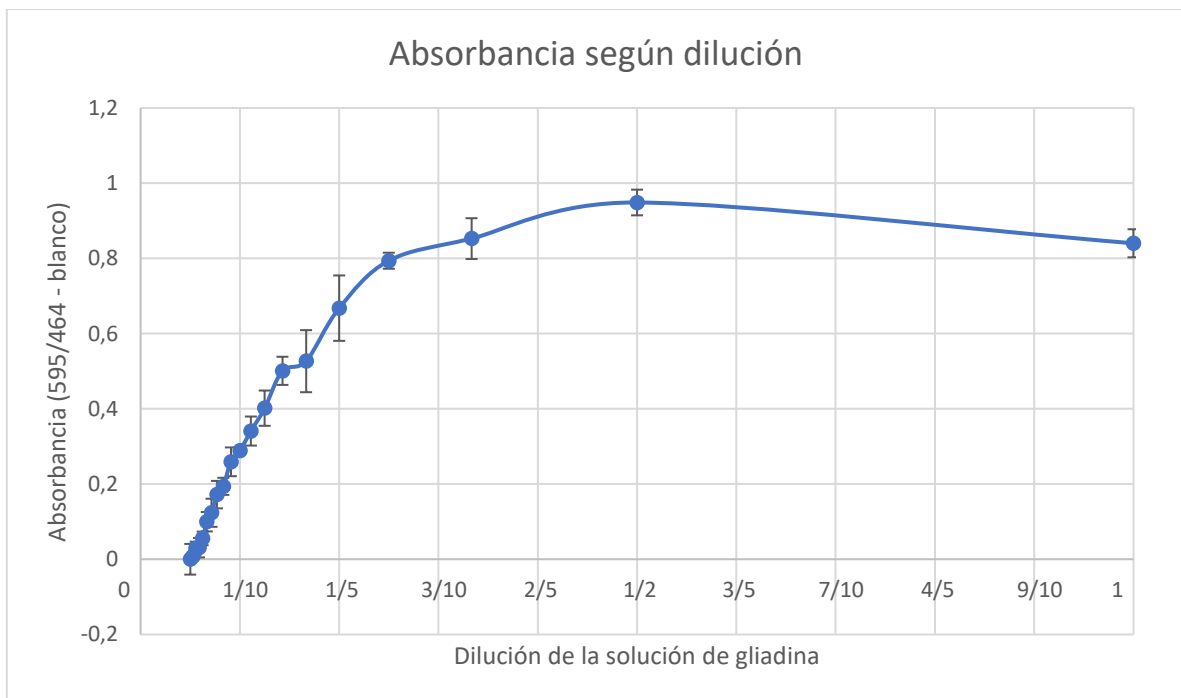


Gráfico 1: Gráfico absorbancia según dilución de la solución de gliadina.

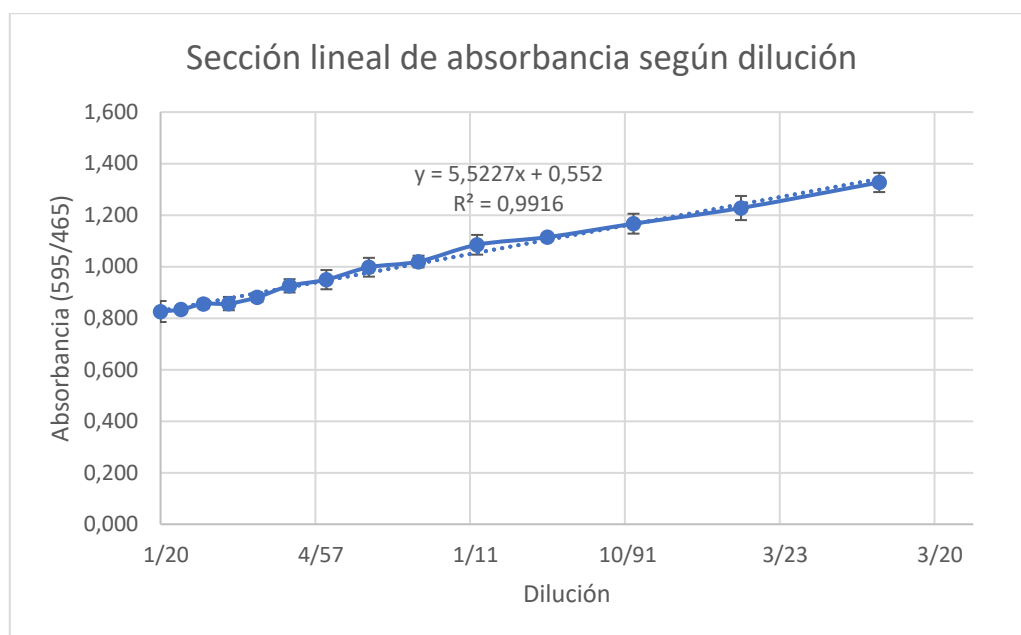


Gráfico 2: Segmento lineal de la curva de absorbanza según dilución de la solución de gliadina. Para efectos de visualización, se graficaron los datos sin restarle el blanco.

8.3 Anexo 3: Medios de cultivo

8.3.1 Medio definido químicamente (CDM)

Para construir un medio que permitiera variar la fuente de nitrógeno sin afectar las concentraciones de los otros nutrientes, se utilizó como base un medio definido químicamente [91] y se modificó según distintos requerimientos. Como se varió la fuente de nitrógeno, se omitieron los aminoácidos y se reemplazaron por triptona o digerido de gliadina, según se requiriera. La concentración de fuente de nitrógeno se obtuvo sumando la concentración de cada aminoácido en el medio original.

Tabla 6: Composición del medio definido modificado.

Componente	Concentración (g/L)
K ₂ HPO ₄	6
Glucosa	11
Acetato de sodio	1
Citrato de amonio	0,6
Ácido ascórbico	0,5
Triptona o péptidos de gliadina	3
Ácido tióctico	0,001
Biotina	0,0025
Ácido nicotínico	0,001
Ácido pantetónico	0,001
Ácido paraaminobenzoico	0,01
Pridoxamina	0,005

Piridoxina	0,002
Riboflavina	0,001
Tiamina	0,001
Vitamina B12	0,001
Adenina	0,01
Guanina	0,01
Inosina	0,005
Xantina	0,01
Ácido orótico	0,005
Timidina	0,005
Uracilo	0,01
MgCl ₂	0,2
CaCl ₂	0,05
MnCl ₂	0,016
FeCl ₃	0,003
FeCl ₂	0,005
ZnSO ₄	0,005
CoSO ₄	0,0025
CuSO ₄	0,0025
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,0025

El pH se ajusta a 5,4 con NaOH. En general, al mezclar los componentes del medio, se obtiene un pH de 5,1.

Para facilitar la construcción del medio, evitar errores de medición, la precipitación de compuestos y el deterioro de compuestos lábiles en el autoclavado, se hicieron concentrados de cloruro de calcio (1000X), metales traza (500X), glucosa (25X) y vitaminas (10X), todos filtrados bajo campana de flujo laminar.

EL volumen total (V_T) del medio consiste en el volumen de los componentes no autoclavables (V_{NA}) y de los autoclavables (V_A) como muestra la siguiente ecuación:

$$V_T = V_{NA} + V_A \quad (1)$$

Los componentes no autoclavables corresponden a las vitaminas (Vit), metales traza (MT), cloruro de calcio (CaCl₂) y la glucosa (G)

$$V_{NA} = V_{Vit} + V_{MT} + V_{CaCl_2} + V_G \quad (2)$$

$$= 10X + 500X + 1000X + 25X \quad (3)$$

$$= \frac{V_T}{10} + \frac{V_T}{500} + \frac{V_T}{1000} + \frac{V_T}{25} \quad (4)$$

$$= \frac{100 * V_T}{1000} + \frac{2 * V_T}{1000} + \frac{V_T}{1000} + \frac{40 * V_T}{1000} \quad (5)$$

$$= \frac{143 * V_T}{1000} \quad (6)$$

$$V_{NA} = 0,143 * V_T \quad (7)$$

Reemplazando (6) en (1) obtenemos que

$$V_T = 0,143 * V_T + V_A \quad (8)$$

Obteniendo que el volumen autoclavable, es decir, el volumen en que se incorporan todos los elementos excepto los no autoclavables se obtiene como

$$V_A = 0,857 * V_T \quad (9)$$

8.3.2 Medio De Man, Rogosa y Sharpe (MRS)

La composición de este medio se obtuvo a partir de literatura [90] y se modificó según la disponibilidad de componentes en el laboratorio. En particular, la composición original considera extracto de carne a una concentración de 10 (g/L), que lo reemplazamos por 5 (g/L) de triptona y 5 (g/L) de extracto de levadura.

Tabla 7: Composición del medio MRS modificado.

Componente	Concentración (g/L)
Triptona	15
Extracto de levadura	10
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
K ₂ HPO ₄	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
MgSO ₄	0,2
MnSO ₄	0,05

El pH se ajusta a 5,4 con HCl.

8.3.3 Terrific Broth (TB)

La composición de este medio se obtuvo mediante literatura [105]. La triptona, el extracto de levadura y el glicerol se autoclavan juntos en 900 ml, mientras que los fosfatos se autoclavan aparte en 100 ml.

Tabla 8: Composición de medio TB.

Componente	Concentración (g/L)
Triptona	12
Extracto de levadura	24
Glicerol	4 ml
KH ₂ PO ₄	2,31
K ₂ HPO ₄	12,54

8.4 Anexo 4: Constructos

8.4.1 Secuencia nucleotídica del constructo "33-mer fusión":

Secuencia aminoacídica del 33-mer con sitio de escisión para enterokinasa
DDDDKLQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF

Optimizando la conversión de aminoácidos a nucleótidos se obtiene:

GACGATGACGACAAATTGCAGTTACAGCCATTCCCACAGCCGCAGTTACCCTATCC
 CCAACCTCAGCTTCCTTATCCACAACACAGTTGCCGTATCCGCAACCACAGCCTT
 TTTGA

La siguiente secuencia corresponde al caset completo que se inserta en los plasmidios
 corresponde

5'-

taatcgcactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaaataattttgttaactttaagaaggagatat
 acat**ATGCATCATCACCATCACCAAC**GATGAAACCGGTAAAGAACTTATCCTGGTTCTG
TACGATTATCAAGAGAAAAGCCCGCGCGAATTGACTATTAAGAAAGGCGATATTTTA
ACCCTGCTCAATTCTACCAACAAGGATTGGTGGAAAGTGGAAGTCAACGACCGTCA
GGGCTTCTTTCCAGCGGCCAACCTGAAAAAACTGGAC**CCACGC****GACGATGACGAC**
AAATTGCAGTTACAGCCATTCCCACAGCCGCAGTTACCCTATCCCCAACCTCAGCT
 TCCTTATCCACAACACAGTTGCCGTATCCGCAACCACAGCCTTTTTTGA**accggt**taact
 cgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccg
 ctgagcaataactagc -3'

Mayúsculas: marco de lectura (met-6histag-SSD-aglia33)

AAAA cola de histidina

AAAA proteína carrier SSD

AAAA sitios de restricción

AAAA sitio de escisión para enterokinasa

A continuación, se ilustra el inserto 33-mer fusión en los plasmidios pBluescript SK II y pET28a.

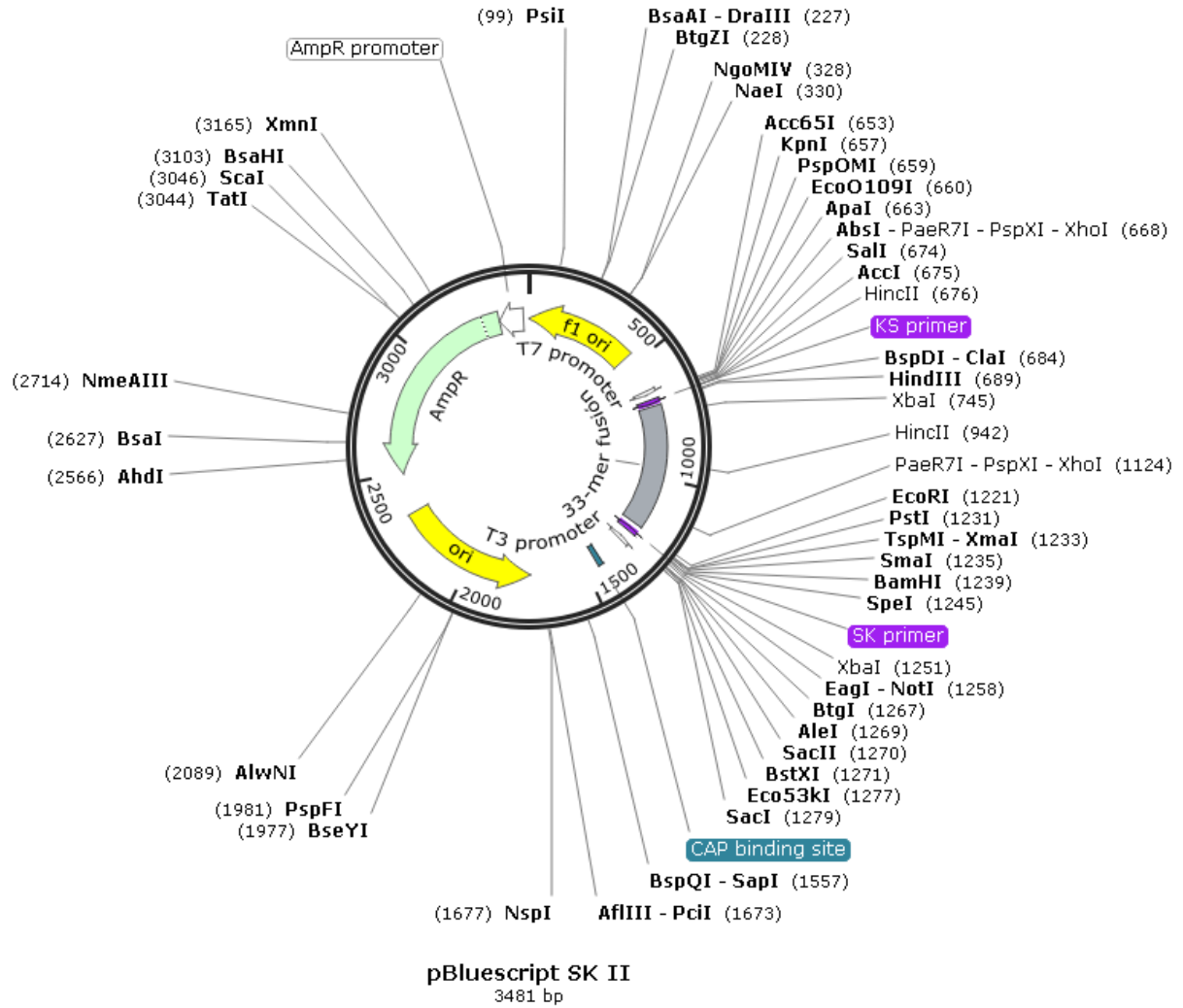


Figura 14: Mapa del constructo 33-mer fusión en el plasmidio pBluescript SK II (+).

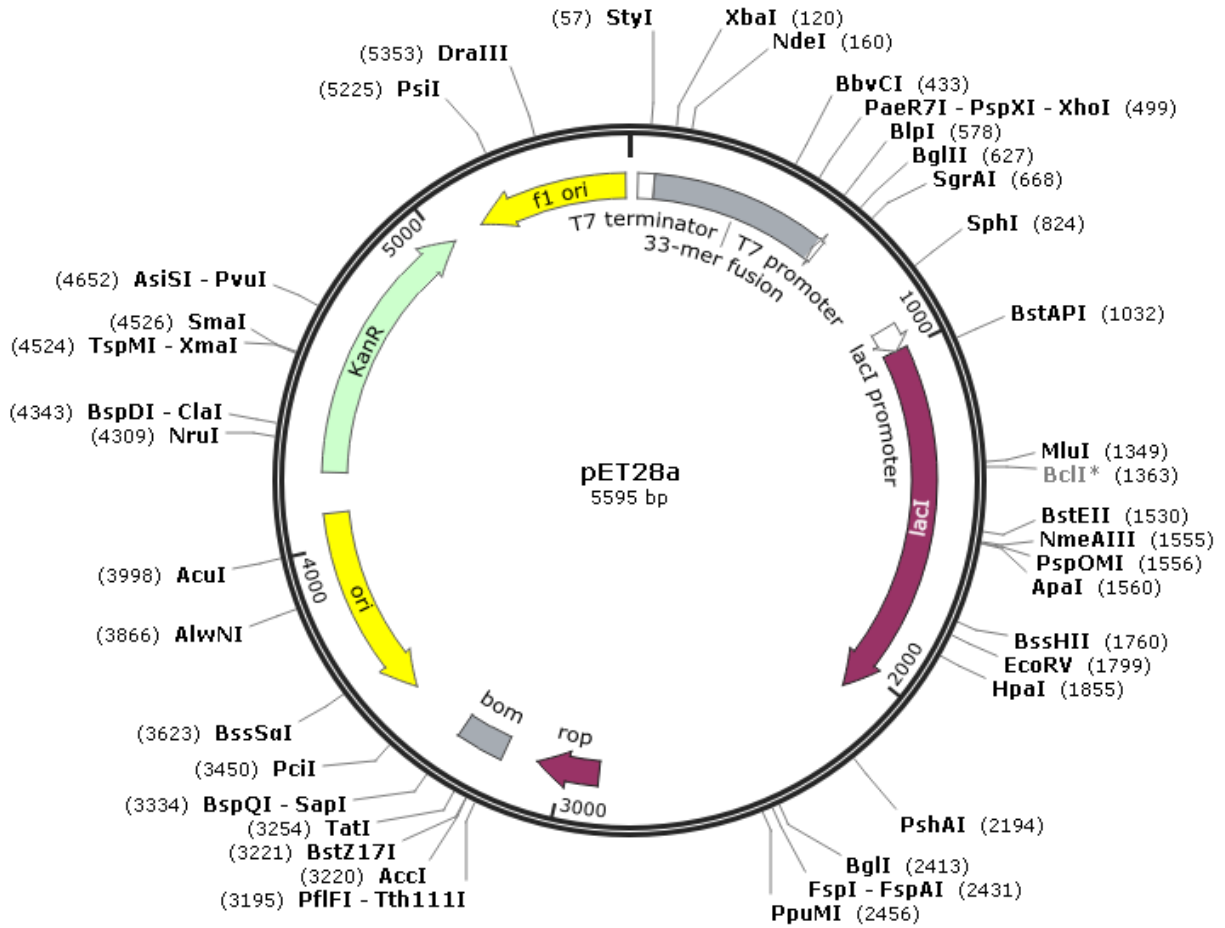


Figura 15: Mapa del constructo 33-mer fusión en el plasmidio pET28a (+).

8.5 Anexo 5: Cálculo del flujo máximo de medio para cultivo continuo.

La tasa de intercambio de nutrientes se expresa como la tasa de dilución D . En estado estacionario, la tasa de crecimiento específico μ de la microorganismo es igual a la tasa de dilución D . La velocidad de dilución se define como el flujo del medio por unidad de tiempo, F , sobre el volumen V del cultivo en el fermentador.

$$D = \mu = \frac{F}{V}$$

En particular, si la tasa de dilución D es mayor que la tasa de crecimiento específico máximo μ_{max} , se eliminan más células de las que se generan en el cultivo, haciendo que eventualmente el cultivo se lave completamente. Por lo que para calcular la tasa de dilución crítica se tiene que:

$$D_{critica} = \mu_{max} = \frac{F_{max}}{V}$$

$$F_{max} = \mu_{max} * V$$

Teniendo en cuenta que la tasa de crecimiento específico máximo de *Lactobacillum plantarum* en medio CDM a 37°C equivale a 0,6 h⁻¹, entonces:

$$F_{max} = 0,6 \left(\frac{1}{h} \right) * 12(ml) = 7,2 \left(\frac{ml}{h} \right) * \frac{1}{60} \left(\frac{h}{min} \right)$$

$$F_{max} = 0,12 \left(\frac{ml}{min} \right) = 120 \left(\frac{ul}{min} \right)$$

Así, el flujo máximo que permite el sistema sin que se lave el cultivo es de 120 µL /min.