



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio de envolturas celulares de bacterias ácido lácticas: aplicaciones biotecnológicas de la proteína *S-layer* y endolisinas de fagos de lactobacilos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área Química Biológica

Licenciada Tania Belén Gordillo

Directora de tesis: Dra. María Mercedes Palomino

Consejera de Estudios: Dra. Nancy Irene Lopez

Laboratorio de Bacterias Gram Positivas, sus Aplicaciones y Estrés
Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Buenos Aires, 2025

Estudio de envolturas celulares de bacterias ácido lácticas: aplicaciones biotecnológicas de la proteína S-layer y endolisinas de fagos de lactobacilos

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido utilizadas por siglos en diversas aplicaciones humanas, por lo que muchas cepas de este grupo han obtenido el estatus de Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS). Además, muchas presentan propiedades probióticas, lo que significa que, al ser administradas en dosis adecuadas, contribuyen al bienestar del consumidor. Asimismo, estas bacterias pueden sobrevivir en el entorno hostil del tracto gastrointestinal, tolerando condiciones como bajo pH, alta concentración de sales biliares y la acción de proteasas. También tienen la capacidad de interactuar con células inmunitarias y adherirse a las mucosas, lo que las convierte en vehículos ideales para aplicaciones biotecnológicas.

El objetivo de esta tesis fue desarrollar un sistema de exhibición de proteínas de interés biotecnológico en la superficie de BAL sin necesidad de modificaciones genéticas. Para ello, se evaluaron dos dominios como *carriers*: el dominio carboxilo terminal de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (CTSlpA) y el dominio de unión a la pared celular (CBD) de la endolisina del fago PL-1 (CBDLys). Ambos dominios fueron fusionados a la proteína verde fluorescente GFP y expresados en *Escherichia coli* como sistema heterólogo. Posteriormente, fueron utilizados para recubrir o “decorar” la superficie de las BAL en ensayos *in vitro*.

El análisis de la proteína ancla CTSlpA reveló que, entre todas las BAL estudiadas, *Lactobacillus acidophilus* exhibe la mayor cantidad de proteína heteróloga. Las pruebas de tolerancia al estrés gastrointestinal mostraron que la retención de la unión se mantiene en valores superiores al 65%, sin comprometer la viabilidad celular. Asimismo, la evaluación de estrategias alternativas de decapado de S-layer, en comparación con la técnica tradicional con LiCl, demostró que el precrecimiento en MRS con NaCl seguido de decapado con NaCl permite retener el 75% del binding, reforzando la seguridad y eficacia de la plataforma de exhibición.

El estudio del ancla CBDLys reveló que, a diferencia de CTSlpA, este dominio tiene la capacidad de unirse a BAL sin capa S, siendo *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27092 la cepa con la mayor capacidad de unión. Con el objetivo de mejorar la adhesión sin afectar la viabilidad celular, se evaluó el crecimiento en condiciones de alta salinidad (NaCl). Esta estrategia resultó en un incremento significativo de la unión mediada por CBDLys, en correlación con modificaciones estructurales en la envoltura bacteriana. Entre estos cambios, se observó una reducción en el contenido de ácido lipoteicoico (LTA) y polisacáridos de pared celular (CWPS), así como una disminución en la O-acetilación del peptidoglicano (PG), lo que sugiere una mayor accesibilidad a los sitios de unión. También se evaluó la retención de la unión y la supervivencia mediante estudios de preservación a 4 °C y post-liofilización. La cepa decorada conservó la capacidad de unión tras la liofilización y mantuvo su viabilidad durante todo el período de estudio.

Además, el decorado celular con la proteína heteróloga mejoró su estabilidad durante el almacenamiento a 4 °C.

Con el fin de evaluar las propiedades de adhesión del sistema, se analizó la unión de las cepas decoradas con los respectivas quimeras en un sistema de adhesión a mucinas *in vitro*, examinando el efecto del tipo de crecimiento y el decorado con la proteína *carrier*. No se observaron diferencias significativas en la adhesión entre células decoradas y no decoradas cuando fueron cultivadas en condiciones estándar. Sin embargo, el crecimiento en alta salinidad generó una disminución significativa en la adhesión.

En conjunto, estos hallazgos permitieron optimizar las condiciones para una aplicación. Como prueba de concepto, la β -galactosidasa, una enzima de gran interés biotecnológico e industrial, fue fusionada a los dominios ancla previamente caracterizados permitiendo su exhibición en la envoltura de las BAL en alta densidad. Este enfoque amplía sus posibilidades de uso en distintas aplicaciones, reforzando el potencial del sistema como una herramienta innovadora y versátil.

Finalmente, en esta tesis se desarrolló un enfoque innovador para la exhibición de proteínas heterólogas en la superficie de bacterias ácido lácticas, a partir de las características estructurales y funcionales de las proteínas expuestas como plataforma para la entrega de proteínas o péptidos bioactivos. Este sistema permite la exhibición de proteínas de interés farmacéutico e industrial en cepas de la familia *Lactobacillaceae* de reconocidas características probióticas, ofreciendo una alternativa segura y eficiente. De modo tal de generar una formulación de grado alimentario y prescindiendo del uso de organismos genéticamente modificados, manteniendo de esta manera, el estatus seguro de los microorganismos empleados y ampliando su potencial aplicación en la industria biotecnológica.

Palabras Claves: Bacterias Ácido Lácticas, Probióticos, *S-layer*, Endolisina, Estrés osmótico, β -galactosidasa.

Study of Cell Envelope Structures in Lactic Acid Bacteria: Biotechnological Applications of the S-layer Protein and Endolysins from *Lactobacillus* Phages

Lactic acid bacteria (LAB) have been used for centuries in various human applications, and many strains of this group have achieved the status of Generally Recognized as Safe (GRAS). Additionally, many of these bacteria exhibit probiotic properties, meaning that when administered in adequate doses, they contribute to the consumer's well-being. Furthermore, these bacteria can survive in the harsh environment of the gastrointestinal tract, tolerating conditions such as low pH, high bile salt concentrations, and protease activity. They also have the ability to interact with immune cells and adhere to mucosal surfaces, making them ideal vehicles for biotechnological applications.

The goal of this thesis was to develop a system for displaying biotechnologically relevant proteins on the surface of LAB without the need for genetic modifications. To achieve this, two domains were evaluated as carriers: the carboxy-terminal domain of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (CTSlpA) and the cell wall-binding domain (CBD) of the endolysin from phage PL-1 (CBDLys). Both domains were fused to green fluorescent protein (GFP) and expressed in *Escherichia coli* as a heterologous system. They were then used to coat or "decorate" the surface of LAB in vitro assays.

The analysis of the CTSlpA carrier revealed that, among all LAB studied, *Lactobacillus acidophilus* exhibited the highest amount of heterologous protein. Gastrointestinal stress tolerance tests showed that binding retention remained above 65%, without compromising cell viability. Additionally, the evaluation of alternative S-layer stripping strategies, compared to the traditional LiCl technique, demonstrated that pre-culturing in MRS with NaCl followed by stripping with NaCl allowed for the retention of 75% of binding, reinforcing the safety and efficacy of the display platform.

The study of the CBDLys carrier revealed that, unlike CTSlpA, this domain can bind to LAB without the S-layer, with *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27092 being the strain with the highest binding capacity. To improve adhesion without affecting cell viability, pre-culturing in high salinity conditions (NaCl) was evaluated. This strategy resulted in a significant increase in CBDLys-mediated binding, correlating with structural modifications in the bacterial envelope. Among these changes, a reduction in lipoteichoic acid (LTA) and cell wall polysaccharides (CWPS) was observed, as well as a decrease in the O-acetylation of peptidoglycan (PG), suggesting greater accessibility to binding sites. Binding retention and survival were also assessed through preservation studies at 4 °C and post-lyophilization. The decorated strain maintained its binding ability after lyophilization and retained its viability throughout the study period. Furthermore, cellular decoration with the heterologous protein improved stability during storage at 4 °C. To evaluate the adhesion properties of the system, the adhesion of decorated strains with the respective carriers was analyzed in an in vitro mucin adhesion system, examining the effect of pre-culturing in high salinity, growth conditions, and decoration with the carrier protein. No significant differences in adhesion

were observed between decorated and non-decorated cells when grown under standard conditions. However, pre-culturing in high salinity resulted in a significant decrease in adhesion.

Together, these findings allowed for the optimization of conditions for an application. As a proof of concept, β -galactosidase, an enzyme of great biotechnological and industrial interest, was fused to the previously characterized carrier domains, allowing its display on the surface of LAB at high density. This approach broadens its potential for use in various applications, reinforcing the potential of the system as an innovative and versatile tool.

Finally, this thesis developed an innovative approach for displaying heterologous proteins on the surface of lactic acid bacteria, based on the structural and functional characteristics of the exposed proteins as a platform for the delivery of bioactive proteins or peptides. This system enables the display of pharmaceutical and industrially relevant proteins on strains of the Lactobacillaceae family, which are recognized for their probiotic characteristics, offering a safe and efficient alternative. This approach allows for the generation of food-grade formulations, without the use of genetically modified organisms, thereby maintaining the safe status of the microorganisms used and expanding their potential applications in the biotechnology industry.

Key words: Lactic Acid Bacteria, Probiotics, S-layer, Endolysin, Osmotic stress, β -galactosidase.

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Gordillo TB, Jastrebow IG, De Rossi C, Lima C, Bockor SS, Allievi MC, Ruzal SM, Fernández Do Porto DA, Palomino MM (2025). Revisiones menores.

Phage PL-1 Endolysin and Osmotic Stress as Tools to Enhance Heterologous Protein Display in Lactic Acid Bacteria Platforms. International Journal of Biological Macromolecules

Gordillo, TB., Palumbo, MC., Allievi, MC., Do Porto, DAF., Ruzal, SM., Palomino, MM (2020). Strategies to display heterologous proteins on the cell surface of lactic acid bacteria using as anchor the C-terminal domain of *Lactobacillus acidophilus* SlpA. World J Microbiol Biotechnol 36, 169. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02945-9>

Palomino, M.M., Allievi, M.C., Gordillo, T.B., Bockor, S.S., Fina Martin, J. & Ruzal, S.M. (2023) Surface layer proteins in species of the family Lactobacillaceae. Microbial Biotechnology, 16, 1232–1249. Available from: <https://doi.org/10.1111/1751-7915>.

AGRADECIMIENTOS

No se como comenzar esta sección, tengo tantos pensamientos y recuerdos, no solo de estos últimos 5 años, sino de la carrera. En primer lugar gracias a todos y a todas, son muchos, así que voy a comenzar.

Muchas gracias a mi directora, la Dra. M. Mercedes Palomino, por permitirme realizar este doctorado bajo su dirección. Por su confianza al brindarme esta oportunidad y por haberme enseñado a trabajar desde el día 0. Gracias por su paciencia y por darme las herramientas y oportunidad para crecer.

Gracias a todos los que conforman los laboratorios: QB 40 y QB 15, ¡Qué personas maravillosas trabajan allí!. QB 41, laboratorio chico, pero con corazón grande.

Gracias a la Dra. Sandra Ruzal, quien hoy se ha jubilado, pero su paso por el laboratorio me ha dejado muchas enseñanzas, con solo escuchar un tema, ella tenía algún aporte valioso. Que bueno fue haber podido compartir un tiempo en el laboratorio en su presencia. Gracias a la Dra. Mariana Allievi, por su compañerismo, por estar dispuesta a escuchar desde un tema de microbiología, docencia o la vida personal. Gracias a la Dra. Mariana Piuri, cada vez que tuve la oportunidad de compartir un seminario, clase o jornada con ella, su conocimiento y experiencia, de alguna forma contribuyó a que pueda mejorar o ir más allá en mi trabajo. Gracias a la Dra. Nancy Lopez, mi consejera de estudio, gracias por sus valiosos aportes en cada comité y en los informes anuales, su vista y experiencia fue de gran valor para mí. A todas, gracias por su ejemplo y por trabajar con entusiasmo, aun en tiempos duros

Gracias a mis compañeras y amigas del laboratorio. A Flor, siento que ella me enseñó a ser becaria, porque me enseñó a festejar los resultados del día a día, fui creciendo viendo a ella como un ejemplo de trabajo y estoy agradecida por eso. Gracias a Viqui y Sabri, mis compañeras desde el primer día. Crecimos juntas y compartimos tantas experiencias. Viqui, me encanta compartir con vos amistad, charlas y gracias por todo el apoyo, cerca y lejos. Sabri, gracias también por tu cariño, compañerismo y amistad, por las charlas de ciudad a Lanús, recuerdo tomar el 33 o el 45 e ir feliz hablando con vos, aunque el viaje sea eterno. Nati, que lindo que fue cuando llegaste al grupo, después de la pandemia, por un par de años no tuvimos otra compañera hasta que llegaste, y qué hermoso conocerte en el curso de fagos, desde ese momento supe que íbamos a tener una excelente compañía y así fue. Gracias por brindarme tu amistad, ayuda y por ser esa persona, con la que una siente que puede hablar de cualquier tema. Este año se nos sumaron nuevas compañeras de doctorado, Iara y Anto, las dos son brillantes, puedo imaginar todo lo bueno que van a lograr. Iara, ¡gracias por todo!, por ser mi “hermanita” de laboratorio, por tu ánimo para trabajar, por toda tu ayuda, de verdad, todo lo que

hiciste es muy valioso para mi, trabajaste muy duro en un momento en el que yo necesitaba mucha ayuda. Anto, gracias también por sumarte a nuestro grupo y por toda tu dulzura, preguntas que me hacen pensar y me permitieron conocerte. Gracias a todas por hacer que sea un hermoso grupo.

También muchas gracias a todas las chicas que pasaron por el laboratorio: Viole, Sol y Julia. Fue maravilloso haber compartido charlas, almuerzos y tiempo juntas.

Mateo paso también por el labo, pero a él lo conocí el primer año de carrera, pasaron 10 años y pasaron muchas cosas en estos años, pero él sigue acá, siendo el mejor amigo que alguien puede tener en el mundo. Gracias Matiu, por estar siempre y brindar todo tipo de apoyo que pude necesitar, cualquier día, en cualquier lugar y en cualquier horario. Que seas mi vecino de laboratorio, fue como un regalo durante el doctorado.

Gracias también a todos los compañeros y compañeras del departamento de QB. A Stefa, Anita por las lindas meriendas, Carlo, Germán y a todos los chicos por la buena onda cada vez que nos cruzamos, que vienen al labo, o que yo voy a QB 30 a charlar con Mateo. Gracias a Bren, por compartir esta experiencia nuevamente, es una experiencia dura, pero hacerlo juntas me hizo sentir acompañada.

Bedelía, actualmente “Coordinación técnica”, ¡Muchas gracias!. Gracias a todas las maravillosas personas que allí conocí, a mis compañeros y compañeras con los que compartí trabajo, pero especialmente gracias a Eva. Eva sos maravillosa y tu forma de trabajar y liderar me ayudó a saber también de qué modo quiero trabajar. Aunque hoy no trabaja acá, gracias a Pato, una maravillosa compañera y persona. Gracias a Male, con quien compartimos un tiempo corto pero hermoso. Gracias a Ailu, también compartimos poco tiempo, pero lo recuerdo con mucho cariño. Gracias a las chicas que actualmente coordinan el grupo con mucha dedicación y talento, gracias Aye y Tami, por todo lo que hacen y por todo su apoyo en esta etapa.

Gracias a la maravillosa facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Un segundo hogar, 10 años consecutivos, yendo todos los días, y no me cansa. Siempre que entro a ciudad siento que estoy en mi lugar, lo sentí cursando análisis matemático, lo sigo sintiendo. Por eso, aunque suene “muy general”, siento agradecer a todas las personas que hacen su esfuerzo para que día a día, este lugar siga funcionando con la excelencia que lo caracteriza.

Gracias a mi familia por estar desde siempre, por haberme apoyado en este largo camino que elegí. Gracias a mi mamá y a Sasha, por ser mis compañeras de esta vida, y ahora también está Anto con nosotras. Gracias chicas por cada fin de semana de risas, memes. Por ayudarme con

su buen ánimo, por su paciencia cuando estoy pasada de cosas, pero por siempre ser comprensivas y darme amor. Gracias a Samu también por todo tu cariño y apoyo. Gracias a papá, por alegrarse cada vez que le contaba o mandaba un mensaje. Gracias a mamá y papá nuevamente, por haber trabajado tanto, para permitirme estar acá y haberme dado la oportunidad de que yo pueda elegir un camino a seguir, se y vi el esfuerzo y sacrificio en sus vidas. Gracias.

Gracias a mis amigas, a Noe por creer en mí, por su paciencia cuando estoy desaparecida porque estoy trabajando mucho, pero que siempre tiene un tiempo para compartir un lindo momento, gracias a las chicas Farias también, por su amistad y apoyo, tanto en la tesis anterior como ahora, con un poco más de distancia. Gracias a Mati, por tu amistad, ahora cómo vecino de Lanús, las noches de juegos y charlas junto a los chicos, siempre fueron momentos especiales. Gracias a Daniela por estar presente a través de mensajes.

Gracias y gracias muy grandes a Ezequiel, mi compañero, el amor de mi vida. Esos 5 años de doctorado, comenzaron con él al lado, y no habría podido imaginar tener una compañía más maravillosa. Gracias por hacer mi vida mas hermosa, gracias por apoyarme de tantas formas, aun cuando ni yo se muchas veces que quiero o que necesito, gracias por estar ahí y por creer en mí, más de lo que yo hago muchas veces. Gracias por tu visión, por tu bondad. No me imagino esto, sin tu compañía la cual, es mejor de lo que podría haber imaginado.

Gracias a Roberta, quién me acompañó en toda la licenciatura y antes. Estuvimos casi todo el doctorado juntas. Mi compañera peluda, quien se subía a mi compu, mis piernas, libros, pero ella siempre estaba cerca. Cuando me acostaba tarde o levantaba temprano, siempre estaba cerca. Hizo que mi vida estos últimos 15 años tenga otro color. Ella también es parte de esta tesis y siempre la voy a recordar.

Con mucho amor, le digo gracias a todos

Pude haber olvidado escribir algo, es difícil resumir 5 años de agradecimientos en algunas páginas. Pero gracias a todos por acompañarme y haberme permitido estar acá. Porque no podría haber llegado a este momento sola.

¡Gracias!

Resumen	1
Abstract	3
Agradecimientos	6
Abreviaturas.....	13
Introducción.....	15
1. Bacterias Ácido Lácticas.....	16
2. Géneros principales.....	17
2.1 <i>Lactobacillus</i> sp.....	20
2.2 <i>Lactocaseibacillus</i> sp.....	22
3. Conservación.....	25
4. Adhesión bacteriana al epitelio intestinal	26
5. Envoltura bacteriana.....	32
5.1 Peptidoglicano.....	34
5.2 Ácidos teicoicos.....	36
5.3 Proteína S-layer.....	38
5.4 Aplicaciones de la proteína de capa S.....	40
6. Bacteriofagos.....	45
6.1 Fagos de BAL.....	47
6.2 Endolisinas de fagos de BAL y sus aplicaciones.....	48
7. Estrés osmótico y modificaciones en la envoltura de BAL	51
8. Aplicación del sistema: exhibición de β -galactosidasa.....	55
Hipótesis y Objetivos.....	60
Materiales y Métodos.....	63
Ensayos de Microbiología.....	64
1. Cepas y medios de cultivo utilizados.....	64
2. Ensayo de unión de proteínas quimeras a cepas de Lactobacillaceae.....	64
3. Estrategias de decapado con NaCl.....	66
4. Ensayos de tolerancia a estrés gastrointestinal.....	66
5. Efecto de tratamientos químicos sobre la unión con GFP-CBDLys.....	67
6. Microscopía.....	67
6.1 Microscopía confocal.....	67
6.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	68
7. Producción stock viral.....	69
8. Cinética de adsorción de fagos.....	69
9. Extracción de componentes de pared.....	70

10. Cuantificación de fósforo.....	72
11. Cuantificación de O-acetilaciones.....	73
12. Cuantificación de Ramnosas.....	73
13. Ensayos de DOT-BLOT de Peptidoglicano.....	74
14. Adhesión a mucinas.....	74
15. Ensayos de conservación en frío y por liofilización.....	75
16. Ensayos de Inmunofluorescencia y Citometría de flujo con marcaje por inmunofluorescencia.....	76
17. Actividad de galactosidasa.....	77
18. Análisis Estadístico.....	77
Ensayos de Biología Molecular.....	78
19. Clonación molecular, construcción de plásmidos y purificación de proteínas.....	78
20. Extracción de ADN cromosómico de Lactobacilos.....	79
21. Aislamiento de ADN del fago.....	80
22. Purificación de proteínas quiméricas.....	80
23. SDS-PAGE.....	82
24. Western-Blot.....	82
25. Análisis de Expresión Génica.....	83
25.1 Extracción de ARN.....	83
25.2 Generación de cDNA y RT-qPCR.....	84
Análisis Bioinformático.....	85
26. Predicción de la estructura secundaria de GFP-CBDLys.....	85
27. Estudio de docking molecular.....	85
ANEXO.....	87
Resultados.....	89
Capítulo 1.....	90
1.1 Exhibición de GFP en la superficie celular de Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 mediada por CT-SlpA.....	91
1.2 Capacidad de unión de SlpA en la superficie de Lactobacillus.....	93
1.3 Análisis de diferentes estrategias de decapado utilizando NaCl.....	94
1.4 Retención de la unión del dominio de anclaje y estudio de la viabilidad en condiciones gastrointestinales in vitro.....	96
1.5 La unión de GFP-CTSlpA a Lactobacillus acidophilus es localizada.....	97
1.6 Conclusiones capítulo 1.....	100
Capítulo 2.....	101
2.1 Clonado, Expresión y purificación de la proteína quimera GFP-CBDLys.....	101

2.2 Capacidad de unión del dominio GFP-CBDLys a Lcb. paracasei ATCC 27092.....	102
2.3 Detección de la capacidad de unión en la superficie de distintas BAL.....	105
2.4 Retención de la unión del dominio de anclaje y estudio de la viabilidad en condiciones gastrointestinales in vitro.....	107
2.5 Identificación del blanco de unión del CBDLys.....	110
2.6 Conclusiones capítulo 2.....	113
Capítulo 3.....	114
3.1 Análisis de la capacidad de unión del dominio CBDLys mediante crecimiento bacteriano en estrés osmótico por NaCl.....	115
3.2 Análisis por microscopía confocal de fluorescencia.....	117
3.3 Modificaciones en la envoltura de Lcb. paracasei ATCC 27092 por estrés osmótico....	119
3.4 Análisis estructural de las interacciones entre CBDLys y el peptidoglicano: estudio in silico.....	123
3.5 Cinética de Adsorción del fago PL-1.....	126
3.6 Conclusiones capítulo 3.....	129
Capítulo 4.....	130
4.1 Ensayos de Adhesión a mucinas.....	131
4.2 Estudios de conservación: almacenamiento en frío y post-liofilización.....	133
4.3 Exposición de β -galactosidasa en superficie de BAL.....	140
4.3.1 Producción y caracterización de las proteínas de fusión β gal-CTSIpA y β gal-CBDLys.....	140
4.3.2 Exposición de β -galactosidasa en superficie de BAL. Inmunofluorescencia y Citometría de flujo con marcaje por inmunofluorescencia.....	141
4.4 Conclusiones capítulo 4.....	146
Discusión y Conclusiones.....	147
Material Suplementario.....	163
MS Capítulo 1.....	164
MS Capítulo 2.....	165
MS Capítulo 3.....	166
MS Capítulo 4.....	169
Bibliografía.....	171

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius	MeOH	Metanol
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	MRS	Man, Rogosa, y Sharpe
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	MUBS	Proteínas de unión a mucinas
ARN	Ácido ribonucleico	MucBP	Proteínas de unión a mucinas
BAL	Bacteria Ácido Láctica	NAG	N-acetil glucosamina
BLP	Bacteria como partículas	NaMur	N-acetil murámico
BSA	Suero de Albumina Bovina	OGM	Organismo genéticamente modificado
CBD	Dominio de unión a pared	ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
CRD	Dominio de reconocimiento a Carbohidrato	PBS	Buffer fosfato de Sodio
CT	Carboxilo Terminal	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CW	Pared Celular	PG	Peptidoglicano
CWPS	Polisacáridos de Pared Celular	PI	Punto isoeléctrico
DO	Densidad Óptica	PK	Fosfoacetolasa
EAD	Dominio de Actividad Enzimática	PLA	Ácido poliláctico
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas	PM	Peso molecular
EPS	Exopolisacáridos	QPS	Presunción cualificada de seguridad
EPS	Exopolisacáridos	RPM	Revoluciones por minuto
EtOH	Etanol	RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcripción inversa
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (EEUU)	SB	Sales biliares
FBP	Proteínas de unión a fibronectina	SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
GH	Glicosil hidrolasas	S-layer	Capa S
GFP	Proteína verde fluorescente	SLAPs	proteínas asociadas a la capa superficial
GOS	Galactooligosacáridos	T °	Temperatura
GRAS	Generalmente reconocidas como seguras	TCA	Ácido tricloroacético
HePS	Heteropolisacáridos	TGI	Tracto gastrointestinal
HoPS	Homopolisacáridos	UFC	Unidad formadora de colonias
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	UFP	Unidad formadora de playas
LCG	Grupo <i>Lactocaseibacillus</i>	WTA	Ácidos teicoicos de pared
LB	Luria Bertani	c.s.p	Cantidad suficiente para
LTA	Ácido Lipoteicoico	mL	Mililitro
		pH	Potencial Hidrógeno
		μg	Microgramos

INTRODUCCIÓN

1. Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) comprenden un grupo diverso de bacterias Gram positivas que han sido utilizadas durante siglos en el procesamiento y la conservación de alimentos. Muchas de sus cepas poseen estatus GRAS (Generally Recognized as Safe) según los criterios de la FDA (Food and Drug Administration, EE.UU.), y también están incluidas en la lista QPS (Qualified Presumption of Safety) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA 2017), lo que respalda su seguridad para el consumo humano.

Dentro de las características que presentan estos microorganismos se destacan las siguientes: generan ácido láctico como producto final de la fermentación, son microorganismos no esporuladores, presentan un bajo contenido de guanina y citosina (G+C) en su genoma. Las bacterias de este grupo se caracterizan por la ausencia de genes que codifican proteínas involucradas en diversas rutas biosintéticas. En consecuencia, se consideran a estos microorganismos como auxótrofos, los cuales se encuentran en ambientes ricos en aminoácidos, purinas y pirimidinas, donde pueden satisfacer sus altos requerimientos nutricionales (Wyszyńska et al., 2015).

Según su metabolismo se consideran anaerobias aerotolerantes y se las pueden clasificar en homofermentativas y heterofermentativas. Las BAL homofermentativas son aquellas que como único producto de la fermentación producen ácido láctico, a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), las heterofermentativas, en cambio, emplean la vía heteroláctica también conocida como vía de las pentosas fosfato o de la fosfocetolasa (PK) produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, CO₂ y etanol o acetato. Este tipo de BAL pueden subdividirse en: i) BAL heterofermentativas facultativas que fermentan las hexosas por la vía EMP y las pentosas por la vía PK y ii) BAL heterofermentativas obligadas que degradan tanto las hexosas como las pentosas por la vía PK (Hammes & Vogel, 1995; W. Liu et al., 2014; Pessione, 2012; Ruiz-Rodríguez et al., 2016; Zaunmüller et al., 2006). La producción de ácido láctico genera un ambiente ácido en su entorno, lo que inhibe el crecimiento de aquellos microorganismos que no toleran tales condiciones de estrés. Respecto a la taxonomía las BAL pertenecen al Filo Firmicutes, Clase Bacilli y Orden *Lactobacillales*.

2. Géneros principales de BAL

Las BAL involucran más de 40 géneros, siendo los principales *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactococcus*, algunas especies de *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* y *Oenococcus*. A continuación se realizará una breve descripción de aquellos géneros que resultaron relevantes para los fines de dicha tesis: *Lactobacillus sp.* y *Lacticaseibacillus sp.* Los géneros mencionados comparten características generales propias de las BAL: son microorganismos anaerobios aerotolerantes y presentan morfología bacilar cuando se observan al microscopio (Claesson et al., 2007). Muchas especies pertenecientes a este grupo se encuentran comúnmente en las cavidades oral, vaginal y regiones intestinales de muchos animales, en la figura 1 se muestra la distribución de BAL junto con otros microorganismos, que forman parte de la microbiota humana.

Además, son microorganismos industrialmente importantes debido a su versatilidad metabólica, estas bacterias presentan numerosas aplicaciones como contribuir a la producción de queso, yogur, leches fermentadas, embutidos cárnicos y alimentos funcionales, a su vez, muchas cepas también se destacan por presentar características probióticas, es decir su consumo en cantidades adecuadas otorga beneficios para la salud del hospedador (C. Hill et al., 2014; Ruiz-Rodriguez & Rello, 2017). Si bien los probióticos se han utilizado de alguna forma durante siglos, el primer informe sobre sus posibles beneficios para la salud se publicó hace más de 100 años por Elie Metchnikoff, quien sugirió que optimizar la composición de los microbios intestinales tendría un efecto positivo en la salud (Metchnikoff et al. 1907). Los productos que contienen probióticos (generalmente suplementos dietarios o alimentos) pueden recomendarse para diferentes condiciones o síntomas que una persona esté experimentando. Diferentes estudios sobre cepas probióticas específicas han revelado beneficios particulares para la salud, como los que se mencionan a continuación: Ayudar a reducir la incidencia de diarrea asociada a antibióticos, contribuir al manejo del malestar digestivo (incluido el síndrome del intestino irritable), ayudar a disminuir los síntomas de cólico en bebés amamantados y la aparición de afecciones atópicas como el eccema en lactantes, ayudar a reducir la enterocolitis necrotizante en bebés prematuros, contribuir a aliviar los síntomas de la mala digestión de lactosa, tratar la diarrea infecciosa aguda en niños y disminuir el riesgo o la duración de infecciones del tracto respiratorio superior (como el resfriado común) o infecciones intestinales.

Por otro lado, las BAL pueden ser utilizadas como “fábricas celulares” en el *delivery* de compuestos terapéuticos, en la producción de productos químicos, farmacéuticos, enzimas u otros productos industrialmente interesantes. Por ejemplo, Abdel-Rahman y col., analizan cómo pueden aumentar la producción de ácido láctico puro a través de cepas de cepas de *Lactocaseibacillus plantarum* modificadas genéticamente, para poder aplicarlo en la síntesis de ácido poliláctico (PLA) (Abdel-Rahman et al., 2013). Otros ejemplos interesantes consisten en la utilización de *Lactococcus lactis* para la generación de vacunas recombinantes. Marelli y colaboradores (2011) trabajaron en el desarrollo de una vacuna viva mucosal contra el rotavirus utilizando esta BAL como vehículo antigénico. Para ello, construyeron cepas recombinantes de *Lc. lactis* capaces de producir la subunidad proteica VP8* de la espícula del rotavirus en tres formas distintas: citoplasmática, secretada y anclada a la pared celular. La respuesta inmune se evaluó en un modelo de ratón; se observó que los animales inoculados oralmente con la cepa que expresaba la forma citoplasmática de VP8* (LL1) desarrollaron niveles significativos de anticuerpos IgA intestinales, mientras que los ratones que recibieron la cepa que presentaba VP8* anclada a la pared celular (LL3) exhibieron anticuerpos anti-VP8* tanto a nivel intestinal como sistémico. Además, se demostró que los anticuerpos intestinales del grupo tratado con LL1 y los anticuerpos séricos del grupo tratado con LL3 bloquearon la infección por rotavirus en un 50% y un 100%, respectivamente. Estos resultados han significado un paso importante hacia el desarrollo de una vacuna mucosal contra el rotavirus (Marelli et al., 2011). Pacini y colaboradores (2022) describieron por su parte una formulación de vacuna intranasal basada en *Lc. lactis* para controlar eficazmente el parásito *Trypanosoma cruzi*. La administración por vía intranasal permitió inducir una respuesta inmune específica tanto a nivel de mucosa como sistémico. En este estudio, las vacunas consistieron en un fragmento recombinante de Trans-sialidasa expresado en *Lc. lactis* y formulado en dos adyuvantes diferentes, demostrando protección frente a la infección en modelos preclínicos (Pacini et al., 2022).

Por todo lo mencionado, las BAL pertenecientes a estos géneros no solo han sido seleccionadas para la industria alimentaria, sino que también pueden emplearse en la producción de metabolitos y enzimas con fines terapéuticos y biotecnológicos.

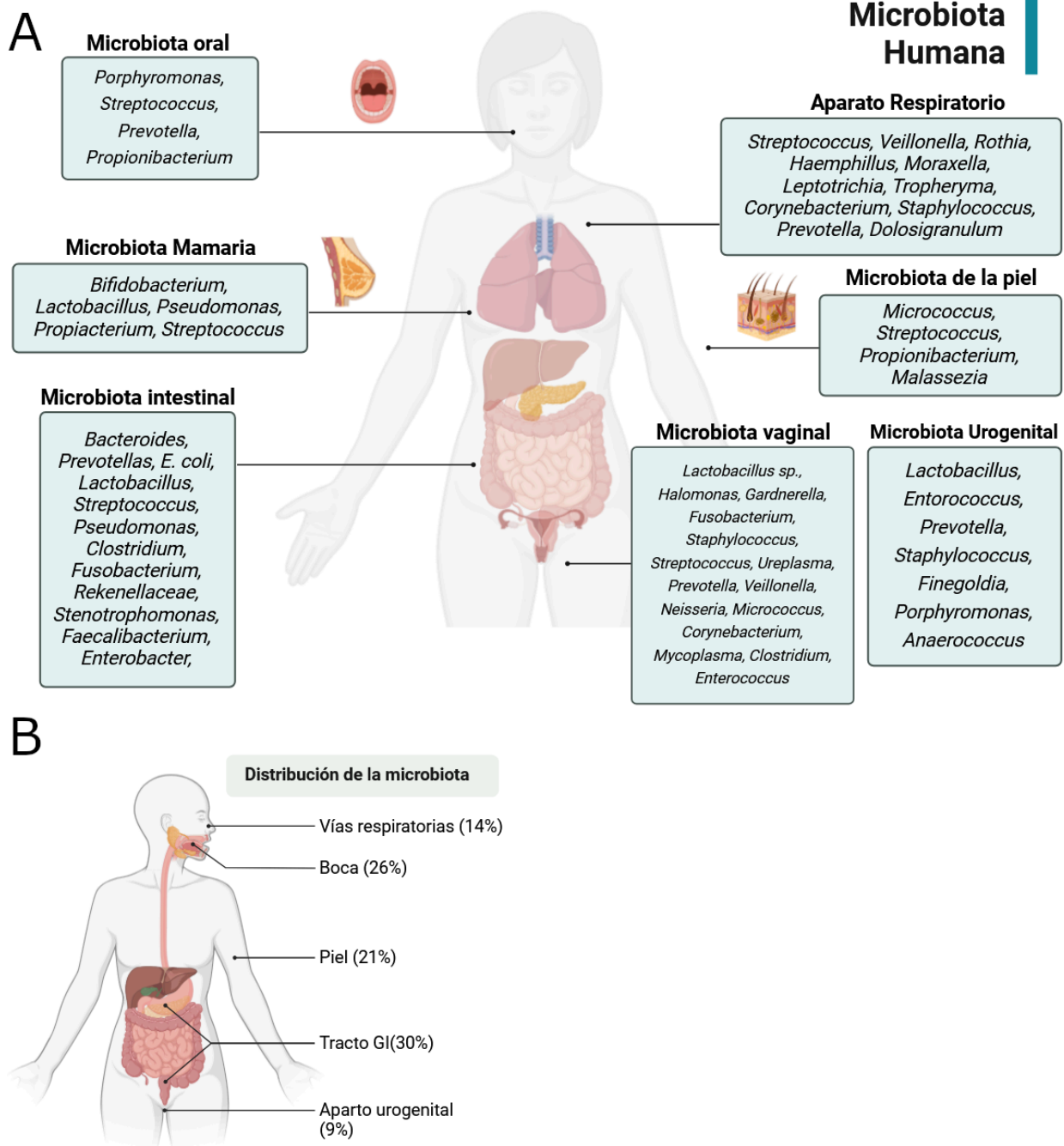


Figura 1. Microbiota Humana. A) La imagen muestra los principales grupos que integran la microbiota humana, de los cuales se destacan varias especies del BAL. B) Distribución en porcentaje de la microbiota humana. Figuras aptadas de <https://biorender.com>

2.1 *Lactobacillus* sp.

Este género es el más amplio y diverso del grupo de las BAL. Se caracteriza por presentar una diversidad filogenética y metabólica que excede el de una familia bacteriana típica. Originalmente, el género *Lactobacillus* fue clasificado basado en la característica fenotípica del tipo de fermentación que realizan. Kandler y Weiss (1986) dividieron al género en tres grupos, con respecto a la presencia o ausencia de las enzimas fructosa 1-6 difosfato aldolasa y fosfocetolasa, enzimas claves en el metabolismo homo o heterofermentativo de las hexosas y pentosas, respectivamente.

Hasta comienzos del 2020, el género *Lactobacillus* comprendía un total de 261 especies. Ese mismo año, Zheng y colaboradores, realizaron estudios evaluando la taxonomía de las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae* mediante secuenciación del genoma completo, utilizando un enfoque polifásico que integró análisis de secuencias genómicas y parámetros de identidad genética para reflejar mejor las relaciones filogenéticas y las características compartidas entre las especies. Como conclusión, *Lactobacillus* sp. pasó de tener 261 especies, a estar agrupado en 38 especies. Se establecieron 23 nuevos géneros, algunos ejemplos de los nuevos géneros son: *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Furfurilactobacillus* y *Ligilactobacillus*, entre otros. Este enfoque refleja mejor las relaciones filogenéticas y las características compartidas entre las especies, agrupando bacterias con características ecológicas y metabólicas más coherentes (Zheng et al., 2020).

Entre los probióticos más utilizados desde hace muchos se encuentran aquellas cepas que pertenecen al género *Lactobacillus*. Entre las especies que han reportado tener cepas probióticas se encuentran: *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. gallinarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. curvatus*, *L. reuteri* y *L. salivarius* (Al-Yami et al. 2022).

Los probióticos del género *Lactobacillus* han demostrado eficacia en una variedad de trastornos y condiciones clínicas, que van desde la diarrea, infecciones urogenitales femeninas, infecciones por *Helicobacter pylori* y enfermedades inflamatorias del intestino, hasta el cáncer (Gupta & Garg, 2009; Higaki, 2003). Existe evidencia de que el consumo de productos lácteos ricos en probióticos reduce el colesterol en sangre, lo cual podría ayudar a prevenir la diabetes, la obesidad, el accidente cerebrovascular y las enfermedades cardiovasculares (Markowiak & Śliżewska, 2017). Lactobacilos, como *L. fermentum*, *Lcp. plantarum* y *L. acidophilus*, disminuyen

el colesterol y mejoran la progresión de la esteatosis no alcohólica. Por lo tanto, *Lactobacillus* puede emplearse como una estrategia beneficiosa para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (N. Y. Lee et al., 2021; Markowiak & Śliżewska, 2017). Además, la administración de *L. rhamnosus* BFE5264 resultó en una reducción significativa del colesterol sérico en un modelo murino alimentado con una dieta alta en colesterol. También se observaron cambios en la flora intestinal y en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). Esta cepa mostró un impacto positivo en el metabolismo del colesterol en el hígado de manera similar a la observada con el tratamiento con estatinas, un fármaco que inhibe la biosíntesis de colesterol en el hígado (Park et al., 2018).

Se ha demostrado que cepas de *Lactobacillus* sp., compiten por nichos ecológicos, producen compuestos antimicrobianos y modulan la respuesta inmune, contribuyendo a reforzar la barrera epitelial y reducir la colonización causada por patógenos (Corr et al., 2007). En la figura 2 se muestra como diferentes cepas y especies de *Lactobacillus* tienen la capacidad de proteger contra patógenos, distribuidos en la piel, el tracto GI y el tracto urogenital.

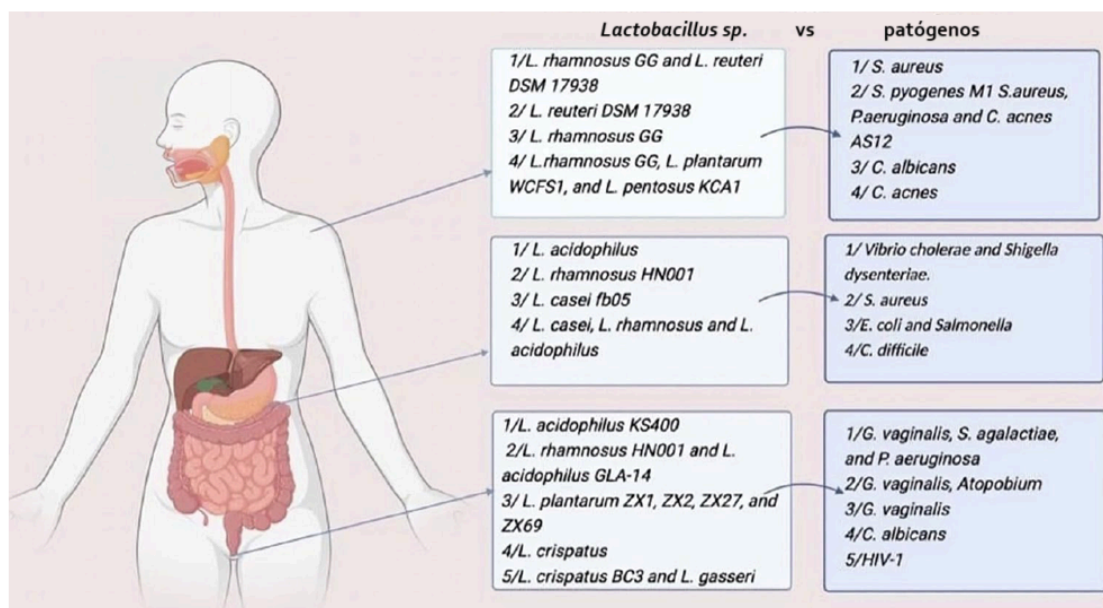


Figura 2. Diferentes especies de *Lactobacillus* identificadas como protectoras del cuerpo humano frente a diversos patógenos en el tracto gastrointestinal, tracto vaginal y piel (Al-Yami et al., 2022)

Particularmente, *L. acidophilus* ATCC 4356, una de las cepas que ha sido objeto de estudio en esta tesis, presenta un metabolismo homofermentativo, es una bacteria anaeróbica

aerotolerante y sus condiciones óptimas de crecimiento son a 30-45 °C y un pH 4-5. Entre los usos más comunes, se encuentran el de ser iniciadores o *starters* en procesos de fermentación en la industria de quesos, leche, carne y vegetales entre otros, también, cumplen un rol fundamental tanto en la preservación de alimentos como en la consolidación de su textura y sabor (Adimpong et al., 2012). Estudios previos han podido demostrar la capacidad probiótica de esta cepa. Khedr y colaboradores, a través de estudios en ratones, pudieron demostrar que esta cepa puede presentar actividad inmunomoduladora y antitumoral lo cual llevó a proponer a *L. acidophilus* ATCC 4356 como un probiótico seguro y efectivo para prevenir la hepatocarcinogénesis en pacientes con riesgo (Khedr et al., 2021). Entre otros estudios, aplicados a la salud, se estudiaron los beneficios de utilizar *L. acidophilus* ATCC 4356 en modelos murinos, donde se destacó su capacidad para proteger contra infecciones por *Toxocara canis* (Cadore et al., 2021) y su papel en el alivio de lesiones renales por isquemia-reperfusión (Zhen et al., 2020). Otro área donde se ha explorado la capacidad probiótica de esta cepa, es en la alimentación, destacando su utilización en yogures y alimentos fermentados. Se ha demostrado que enriquecer la leche con extractos como cáscara de granada y extracto de dátiles, así como con cepas probióticas como *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, LA-05 y LA-308, puede aumentar significativamente la capacidad antioxidante, el contenido total de fenoles y la carga probiótica del producto final. La sinergia entre los compuestos bioactivos de los extractos vegetales y las cepas probióticas podría ser clave para crear alimentos más saludables y con valor agregado (Y. Liu et al., 2024).

2.2 *Lacticaseibacillus* sp.

Pertenecen al grupo de BAL, por lo tanto son Gram-positivas, al observarlas al microscopio se puede observar que presentan forma de bacilos (aproximadamente entre 0,8 a 1,0 por 2,0 a 4,0 µm), a menudo con extremos cuadrados, se pueden encontrar de forma individual o formando filamentos. Son organismos inmóviles y su temperatura de crecimiento se encuentra entre 10 y 40°C; algunas cepas crecen a entre 5 y 45°C. Son heterofermentativas facultativas (Zheng et al. 2020). Particularmente, *Lacticaseibacillus casei* y *Lacticaseibacillus paracasei* (nombres anteriores *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*), están distribuidos en una variedad de hábitats y ambientes, tales como lácteos fermentados, vegetales, también en el tracto gastrointestinal de humanos y animales (Fontana et al., 2018; D. Hill et al., 2018; Zheng et al.,

2020). *Lcb. casei* y *Lcb. paracasei* pertenecen al grupo *Lacticaseibacillus group* (LCG, de sus siglas en inglés). Este grupo compuesto por *Lcb. casei*, *Lcb. paracasei* y *Lacticaseibacillus rhamnosus*, organismos que están estrechamente relacionados filogenética y fenotípicamente (Hill et al., 2018). Entre las LCG, *Lcb. casei* y *Lcb. paracasei* son quienes están más relacionadas (Cui et al., 2020). Las tres especies han sido ampliamente estudiadas, clasificadas y reclasificadas debido a sus propiedades y beneficios que pueden generar para la salud del hospedador (D. Hill et al., 2018). En los últimos años se han ampliado los estudios sobre las cepas de *Lacticaseibacillus paracasei* debido a que miembros de este grupo son utilizados en alimentos, industria farmacéutica como probióticos, debido a esto también su clasificación y taxonomía ha sido discutida (Wuyts et al., 2017). Se han reportado muchos beneficios en la literatura para las cepas de *Lcb. paracasei*. Estos incluyen actividad antimicrobiana y antibiofilm; estimulación del sistema inmunológico; efectos antiinflamatorios, antioxidantes, anti obesidad y antiproliferativos/proapoptóticos; mejora del metabolismo lipídico, efectos hipocolesterolémicos y moduladores del estrés; y la potenciación de la microbiota bacteriana intestinal, entre otros (D. Hill et al., 2018; Jones et al. 2017; Bengoa et al., 2021). Es importante destacar que las propiedades promotoras de la salud pueden atribuirse al consumo de microorganismos cuando estos se mantienen viables, ya que generan moléculas *in situ* que también contribuyen al bienestar, así como a los metabolitos producidos durante la fermentación, los cuales están asociados con los cambios en la matriz de los alimentos que los contienen. Una de las moléculas efectoras atribuidas a las propiedades promotoras de la salud de *Lcb. paracasei* son los polisacáridos extracelulares, que pueden secretarse al entorno en forma de exopolisacáridos (EPS), EPS viscoso (*slime* EPS) o pueden estar unidos a la superficie celular en forma de cápsula (CPS). Aunque no todas las funciones de los EPS en las células bacterianas han sido dilucidadas, se sabe que brindan protección contra efectos ambientales adversos y factores biológicos (como la respuesta inmune), facilitan la colonización al formar estructuras que estabilizan el biofilm y promueven la transducción de señales celulares (Öner, 2013; Oleksy & Klewicka, 2018).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la adición de cepas de *Lacticaseibacillus paracasei*/*Lacticaseibacillus casei* en productos lácteos proporciona beneficios a los consumidores. Por ejemplo, *Lcb. casei* Q14 puede mejorar la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) (Qu et al., 2018; Sato et al., 2017). La cepa *Lcb. casei* Shirota en leche fermentada redujo la translocación bacteriana y alteró la microbiota intestinal en pacientes japoneses con T2DM

(Sato et al., 2017). El consumo de *Lcb. casei* Q14 en yogur podría mejorar los niveles de glucosa e insulina en sangre, además de reducir la expresión génica de enzimas críticas relacionadas con la gluconeogénesis hepática (Qu et al., 2018). Otros estudios muestran que la obesidad está asociada con cambios en la microbiota intestinal y parámetros inmunológicos. Un producto lácteo fermentado que contiene *Lcb. casei* CRL 431 administrado a ratones fue capaz de afectar positivamente la microbiota, así como algunos biomarcadores asociados con la obesidad (Núñez et al., 2014). En un modelo murino de obesidad, se evaluó a *Lcb. casei* Shirota por su capacidad para mejorar el manejo del peso en comparación con Orlistat, un medicamento utilizado para tratar la obesidad. Los resultados de ese estudio arrojaron que la suplementación con *Lcb. casei* Shirota mejora el manejo del peso corporal y los niveles de algunos biomarcadores relacionados. Además, la suplementación con *Lcb. casei* Shirota mostró mejores resultados en la reducción de la masa grasa y la alanina aminotransferasa en comparación con Orlistat (Karimi et al., 2015; Núñez et al., 2014).

Por otra parte, se evaluó el efecto de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 en factores clínicos y relacionados con la microbiota intestinal en el Síndrome del intestino irritable (IBS por sus siglas en inglés *Irritable Bowel Syndrome*). En un ensayo clínico con 40 pacientes, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 redujo significativamente la abundancia del género *Ruminococcus* (especialmente *R. bromii* y *R. callidus*). También se observó un aumento de los niveles de ácidos grasos de cadena corta (acetato y butirato), y disminuyó la concentración de la citocina proinflamatoria IL-15, lo que se asoció con una mejora parcial de los síntomas del síndrome de intestino irritable (IBS). Estos resultados indican que *Lcb. paracasei* CNCM I-1572 modula la función del microbioma intestinal y atenúa la activación inmunitaria en IBS, sentando las bases para futuros estudios con mayor potencia estadística dirigidos a evaluar su impacto clínico sobre los síntomas del trastorno (Cremon et al., 2018; Cremon 2017). Estos son solo algunos ejemplos de los estudios recientes de cepas del grupo LCG y su acción como cepas probióticas.

Como se mencionó anteriormente, estas cepas representan herramientas importantes en la producción de alimentos fermentados, en la industria y también por su potencial como probióticos. Por eso, es necesario establecer protocolos de conservación, que aseguren su viabilidad y estabilidad.

3. Conservación

En el estudio de BAL, es de importancia conocer cuáles son los métodos de conservación más eficientes. Particularmente cobra un gran interés la conservación de cepas probióticas. Dada su relevancia y aplicaciones en las áreas de alimentos, biotecnología e industria, resulta fundamental contar con un método de almacenamiento que garantice la preservación óptima de estos microorganismos. Para ejercer su beneficio para la salud, los probióticos deben superar algunos desafíos tecnológicos y fisiológicos. Por ejemplo, deben resistir los procesos de fabricación y permanecer viables dentro de un producto. También se espera que sobrevivan al paso a través del tracto gastrointestinal y permanezcan viables en números suficientes en el lugar donde ejercen su acción ya que el mismo debe entregar una dosis adecuada de cepas viables, durante todo el periodo de almacenamiento (Wendel, 2021; Poddar *et al.*, 2022). Es por ello que uno de los aspectos cruciales que se tienen en cuenta a la hora de almacenar, es la supervivencia de los mismos. El mantenimiento de un número considerable de células viables durante el almacenamiento es importante para el uso de productos comerciales que contengan probióticos. Existen diversas formas de almacenar estos microorganismos, como por ejemplo refrigeración a 4 °C, secados por aspersión, congelamiento entre otros. Sin embargo el proceso de liofilización es considerado el método más exitoso para preservar probióticos (Han *et al.*, 2022). Cuando un producto es liofilizado, permite que haya menores costos de almacenamiento y transporte y manejo más fácil que otros métodos, como refrigeración a 4 °C o congelamiento (Santivarangkna *et al.*, 2008; Velly *et al.*, 2015), la liofilización también ayuda a mantener la estabilidad de productos como medicamentos durante la producción y prolonga la vida útil de los productos terminados (Wang *et al.*, 2020; Wendel, 2021).

El proceso de liofilización consta de tres pasos principales: congelación, secado primario y secado secundario. Así, el agua se elimina de las formulaciones mediante la sublimación del hielo y la posterior desorción del agua no congelada bajo vacío (Lee *et al.* 2009). La liofilización es un proceso ampliamente utilizado para la preservación y almacenamiento a largo plazo de muestras biológicas. Sin embargo, durante la liofilización, las células experimentan condiciones ambientales extremas como baja temperatura y baja actividad de agua que producen daño estructural y fisiológico a las células bacterianas, lo que resulta en la pérdida de viabilidad de muchas especies. Para prevenir o reducir estos efectos secundarios no deseados, se agregan comúnmente sustancias protectoras a las muestras antes de la congelación o liofilización

(Zárate & Nader-Macias, 2006). Los carbohidratos pueden reemplazar el agua que interactuaba originalmente con la membrana celular durante el proceso de secado, estabilizando así los lípidos y proteínas de la membrana celular y previniendo daños. La leche descremada es un crioprotector comúnmente utilizado, ya sea solo o en combinación con otros crioprotectores. La tolerancia de los microorganismos al secado por aspersión varía. Las bacterias Gram-positivas son más resistentes que las Gram-negativas, lo que probablemente se deba a discrepancias en su genoma, pared celular y composición de la membrana. Estudios anteriores mostraron que incluso organismos estrechamente relacionados pertenecientes a la misma especie tienen diferentes tolerancias contra el secado por aspersión probablemente debido a la variación genética causada por mutación (Mahmoodian et al., 2024). El proceso de congelación, especialmente la velocidad de enfriamiento, podría dañar las células (Beezer et al., 1976). Una velocidad de enfriamiento muy lenta puede resultar en la muerte de las células causada por cambios en la presión osmótica, mientras que una velocidad de congelación muy rápida puede causar la muerte celular por daño mecánico en las membranas celulares causado por la recristalización del hielo intracelular (Beezer et al., 1976; Meryman, 1971). Los probióticos también se comercializan en forma de tabletas, gránulos y pellets (Fredua-Agyeman, 2024). Es por eso, que con la variedad de métodos existentes es importante poder conocer cual es más apropiado, según los requerimientos del microorganismo que se esté empleando.

Una vez garantizada la viabilidad de las cepas mediante protocolos de conservación óptimos otro de los aspectos claves a evaluar es la capacidad de las cepas para adherirse al epitelio intestinal. Para evaluar esta característica, comúnmente se recurre a abordajes experimentales como los ensayos de adhesión a mucinas o a células tipo Caco-2, que permiten estimar su potencial de interacción con la superficie intestinal.

4. Adhesión bacteriana al epitelio intestinal

La capacidad de adhesión al huésped es un criterio clásico y deseado para la selección de potenciales bacterias probióticas, ya que podría generar una colonización transitoria que contribuiría a estimular la función de la barrera intestinal y las funciones metabólicas. Por ejemplo, esta colonización temporal favorece la acción local de metabolitos producidos por probióticos, como en el caso de los ácidos grasos de cadena corta, así como efectos inmunomoduladores mediante moléculas ubicadas en la superficie bacteriana que actúan como ligandos para receptores del huésped en el epitelio intestinal, induciendo vías de

señalización. Asimismo, las bacterias probióticas tienen un rol protector potencial frente a enteropatógenos mediante distintos mecanismos, que incluyen la producción de compuestos antimicrobianos, la reducción de la adhesión de bacterias patógenas y la competencia por los sitios de unión en las células del huésped. La exclusión competitiva por bacterias probióticas tiene un efecto beneficioso no solo en el intestino, sino también en el tracto urogenital y la cavidad oral. Por otro lado, las BAL también pueden actuar como barreras frente a patógenos y toxinas al evitar su adhesión a receptores epiteliales, mientras pueden mejorar la capacidad de adhesión de cepas probióticas, lo que sugiere que el desarrollo de nuevos productos simbióticos podría ser una herramienta potencial para aumentar el tiempo de residencia de las bacterias probióticas en el intestino (Celebioglu et al., 2017). Además, los prebióticos (sustratos utilizados selectivamente por microorganismos del huésped que confieren un beneficio para la salud), también pueden funcionar como “falsos receptores”, inhibiendo la adhesión de algunas bacterias patógenas al intestino, según lo revisado por Hickey (Hickey, 2012) (Figura 3). Los estudios *in vitro* con diferentes líneas celulares intestinales han sido ampliamente utilizados en las últimas décadas para evaluar la capacidad de adhesión de bacterias probióticas y su antagonismo frente a patógenos. Sin embargo, la extrapolación de estos resultados a condiciones *in vivo* sigue siendo incierta, lo que genera la necesidad de optimizar enfoques *in vitro* más complejos que incluyan la interacción con la microbiota residente para abordar las limitaciones actuales.

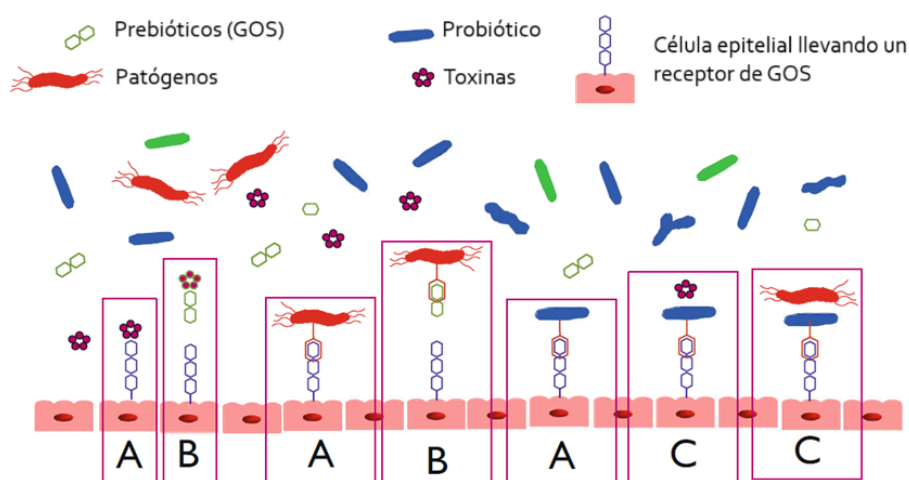


Figura 3. Representación esquemática de las propiedades antiadhesivas de los probióticos y prebióticos. (A) Los patógenos, probióticos y las toxinas bacterianas pueden adherirse al

receptor. (B) Oligosacáridos prebióticos, particularmente galactooligosacáridos tienen cierta similitud estructural con las glicoproteínas de la superficie celular y pueden inhibir la adhesión de toxinas y patógenos a las células. (C) La adhesión de bacterias probióticas a los receptores de la superficie celular inhibe la adhesión de toxinas y patógenos a esos receptores. Adaptado de Monteagudo-Mera et al., 2019.

La capa de mucus que recubre las células epiteliales del tracto gastrointestinal actúa como una barrera física para proteger contra la invasión de microbios patógenos. Por otro lado, también funciona como un sitio importante de colonización para bacterias comensales. El mucus intestinal está compuesto principalmente por mucinas y glicoproteínas que se ensamblan en una estructura compleja similar a una red que se adhiere a las células epiteliales (Sicard et al., 2017). El glicocáliz es una capa que contiene glucolípidos y glicoproteínas que recubre las células epiteliales del intestino. La consistencia viscosa de esta capa protege al epitelio intestinal de daños mecánicos y dificulta la colonización bacteriana, proporcionando una defensa contra infecciones bacterianas. Esta capa mucosa está compuesta principalmente por proteínas glicosiladas (mucinas), además de glucolípidos, inmunoglobulinas y electrolitos (Bron et al., 2011). Aunque el grosor de esta capa de mucus varía a lo largo del tracto digestivo, en el colon, donde la concentración de microbios es mayor, la porción más interna y densa del mucus generalmente está libre de bacterias en individuos sanos. Por lo tanto, la persistencia bacteriana está en gran medida relacionada con la capacidad de adherirse al mucus o a componentes de la matriz extracelular (ECM), en lugar de a las propias células epiteliales, que normalmente sólo están en contacto directo con microbios patógenos invasivos en el contexto de ciertas enfermedades (Fidanza et al., 2021). Los residuos de azúcar de las mucinas pueden actuar como ligandos para receptores de membrana bacteriana. De hecho, se ha asociado la alteración en los patrones de glucosilación con disbiosis durante procesos de inflamación intestinal (Larsson et al., 2011; Sommer et al., 2014). Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las bacterias probióticas más comúnmente utilizadas. Ambos géneros, comparten moléculas superficiales comunes, como los ácidos lipoteicoicos (LTAs), proteínas asociadas a la capa superficial (SLAPs) y proteínas de unión a mucinas (Mubs), que desempeñan un papel importante en la interacción con componentes del mucus (Lebeer et al., 2010; Sommer et al., 2014). La adhesión bacteriana a las superficies intestinales puede iniciarse mediante un proceso físico no específico, como interacciones hidrofóbicas, seguido de

una segunda etapa de adhesión específica mediada por componentes de la pared celular (Haddaji et al., 2015). Algunos estudios han reportado una correlación entre la hidrofobicidad y la capacidad de adhesión (Pan et al., 2006). En este sentido, la presencia de algunas proteínas superficiales, como las proteinasas ancladas a la pared celular, ha demostrado aumentar la hidrofobicidad y la adhesión en algunas bacterias ácido-lácticas (Muñoz-Provencio et al., 2012; Pan et al., 2006; B. Zhang et al., 2015; Radziwill-Bienkowska et al., 2017).

La presencia de adhesinas en la pared celular bacteriana también desempeña un papel clave en la adhesión al intestino. Las proteínas de unión a mucinas son adhesinas superficiales que contienen dominios Mub y/o MucBP (MUCin-Binding Protein), capaces de unirse a mucinas y vinculadas a la pared celular de peptidoglicano mediante un motivo Carboxilo terminal, Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPxTG) (Figura 4). Aunque los dominios MucBP se encuentran en diversas especies bacterianas, incluidas bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* (Popowska et al., 2017), los dominios Mub se hallan casi exclusivamente en bacterias ácido lácticas aisladas del tracto gastrointestinal humano (Boekhorst et al., 2006; Van Tassell & Miller, 2011).

Las fimbrias o pili, que son delgadas extensiones proteicas de las células bacterianas, también pueden promover la adhesión. Junto con las proteínas de unión a mucinas y los pili, otras proteínas de superficie, como las de unión a fibronectina (FBPs) y las de la capa superficial (SLPs), también pueden contribuir a la adhesión de las bacterias a la mucosa intestinal. La fibronectina es una glicoproteína de la matriz extracelular que puede encontrarse en forma insoluble en el intestino. Las FBPs han sido caracterizadas tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. La presencia de estas proteínas se ha asociado con la virulencia de algunos patógenos debido a su potencial para invadir las células epiteliales del huésped. Sin embargo, en el caso de bacterias probióticas, la presencia de FBPs podría ser beneficiosa, ya que podrían aumentar su capacidad de adhesión a las células del huésped, favoreciendo la exclusión de patógenos (Hymes et al., 2016; Lehri et al., 2015).

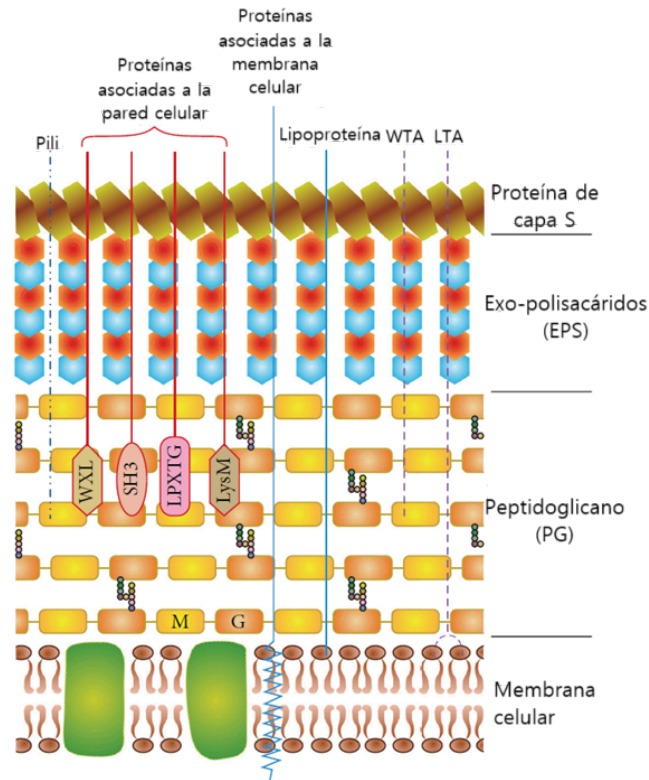


Figura 4. Envoltura celular de lactobacilos con una representación esquemática de proteínas asociadas a la pared celular y la membrana. La membrana celular, con proteínas embebidas, está cubierta por una capa de PG, decorada con ácidos lipoteicoicos (LTA), ácidos teicoicos de pared (WTA), pili, proteínas y lipoproteínas. Los exopolisacáridos (EPS) forman una cubierta gruesa estrechamente asociada al PG y están rodeados por una capa externa de proteínas de capa S. Las proteínas se anclan a la pared celular de dos formas: Covalentemente (proteínas con motivo LPXTG) y no covalentemente (presentando dominios LysM, SH3 o WXL). También pueden estar: Ancladas a lípidos en la membrana celular (lipoproteínas) y/o unidas a la membrana celular mediante hélices transmembrana en sus extremos N- o C-terminal. Adaptado de Sengupta et al., 2013.

La adhesión de bacterias probióticas se ha evaluado comúnmente *in vitro* utilizando mucinas adsorbidas sobre superficies abióticas y líneas celulares tumorales humanas como Caco-2 y HT-29 (Lebeer et al., 2012; Monteagudo-Mera et al., 2019; Tuo et al., 2013; Garriga et al., 2015) para imitar la adhesión a las células epiteliales intestinales (IECs).

A partir de la secuenciación genómica de *L. acidophilus* NCFM se identificaron genes que codifican proteínas asociadas previamente a mecanismos de adhesión en otras bacterias

Algunos de estos genes fueron inactivados inactivaron, incluidos dos homólogos de R28 estreptocócicos, una proteína de unión a fibronectina (FbpA), una proteína de unión a mucina (Mub) y una proteína de capa superficial (SlpA), de los cuales los homólogos de R28 y la proteína Mub (LBA1392) son proteínas dependientes de sortasa. Ese estudio demostró que los genes que codifican FbpA, Mub y SlpA contribuyen todos a la capacidad de *L. acidophilus* NCFM para adherirse a células Caco-2 *in vitro*, confirmando que la adhesión está determinada por múltiples factores. Las mutaciones de *mub* y *fbpA* resultaron en disminuciones del 65% y 76% en la adherencia, respectivamente (Buck et al., 2005)

La capa de mucus desempeña un papel en la protección de las células epiteliales intestinales contra daños, pero también se considera crítica para la adhesión de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal. En consecuencia, la adhesión exhibida por lactobacilos en la mucina ha atraído atención como uno de los factores críticos que contribuyen a los efectos beneficiosos persistentes de *Lactobacillus* en un entorno intestinal en constante cambio.

Por otra parte, para ejercer sus efectos beneficiosos en el intestino, los probióticos deben ser capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal, incluyendo el ambiente extremadamente ácido del estómago y las condiciones de sales biliares en el intestino delgado, así como adherirse a las células epiteliales intestinales (Nishiyama et al., 2016; Deng et al., 2015; Górska et al., 2022).

La exposición a las condiciones gástricas e intestinales a lo largo de los fluidos del tracto digestivo es el principal estrés que podría afectar la viabilidad de los microorganismos probióticos ingeridos (Liong & Shah, 2005). Cuando una cepa probiótica está destinada a la administración oral, debe ser capaz de sobrevivir a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (TGI) para alcanzar viva su sitio de acción, es decir, el intestino delgado y grueso. La tolerancia a la acidez, la bilis y la pancreatina *in vitro* predice el comportamiento de las bacterias ácido lácticas en las condiciones encontradas en el TGI (Bengoa et al., 2018). El pH del estómago puede variar entre 2 y 6 dependiendo del estado de ayuno, lo que afecta la eficiencia de cualquier sistema de entrega sensible al pH, mientras que el del intestino delgado varía entre 7 y 8,5; lo que es favorable para la supervivencia bacteriana. Sin embargo, la presencia en el intestino delgado de pancreatina, que es una mezcla de varias enzimas digestivas (amilasa, lipasa y proteasa) producidas por células exocrinas del páncreas, y sales biliares, cuya concentración oscila entre 0,2 y 2% puede tener efectos adversos en las células probióticas (Whitehead et al., 2008). Además la supervivencia a la exposición a sales biliares

representa un criterio importante para definir una potencial cepa probiótica. Diferentes bacterias probióticas muestran una resistencia diferencial a concentraciones normales de sales biliares y se ha sugerido que la tasa de supervivencia de las cepas probióticas debería variar entre 20 y 40%. Sin embargo, muchos microorganismos tienen una tasa de supervivencia de menos de 0,1% (Bezkorovainy, 2001; Whitehead et al., 2008). Un factor determinante para que los microorganismos puedan tolerar tales condiciones de estrés, es la integridad y composición de la envoltura bacteriana, es por eso, que cobra importancia poder comprender cómo está conformada y regulada.

5. Envoltura bacteriana

La pared celular de las bacterias Gram-positivas consiste en un complejo ensamblaje de glicopolímeros y proteínas. Seguida de la membrana celular, se encuentra una gruesa pared de peptidoglicano. El peptidoglicano es el componente más importante de la pared celular en términos de dimensión y peso molecular, el cual se encuentra decorado con ácidos teicoicos (LTA y WTA), polisacáridos (CWPS) y proteínas. La pared celular cumple múltiples funciones durante el crecimiento bacteriano, incluyendo el mantenimiento de la integridad y la forma de la célula bacteriana, así como la resistencia a la presión de turgencia interna. Además, debe permanecer flexible para permitir la remodelación necesaria durante la división y el crecimiento celular. Dado que actúa como interfaz entre la célula bacteriana y su entorno, la pared celular también media las interacciones bacterianas con superficies abióticas, bacteriófagos infectantes o células huésped eucarióticas (Chapot-Chartier, 2014). La envoltura celular es la primera línea de defensa contra los cambios ambientales, es una barrera física que separa la célula de su entorno y, como tal, actúa como el primer sensor para supervisar las modificaciones en el medio. Se ha demostrado que los cambios en la composición química de envoltura provocada por el estrés osmótico ayudan a la supervivencia celular (Chapot-Chartier, 2014; Palomino et al., 2013; Piuri et al., 2005).

Por otra parte, los ácidos teicoicos son el segundo componente principal de las paredes celulares en bacterias Gram-positivas. Otras estructuras encontradas en la envoltura son los CPS (Polisacáridos asociados a pared), a diferencia del PG, los LTA y los WTA, no presentan una estructura central común. Las moléculas CPS son generalmente heteropolisacáridos largos formados por subunidades repetidas con diferentes residuos de azúcar, aunque también pueden ser polisacáridos. También pueden encontrarse cadenas de glicano en proteínas

asociadas a la pared celular, aunque la presencia de estas glicoproteínas aún no está bien documentada. Algunas proteínas son secretadas, como las proteínas multifuncionales tipo lectina que se unen a residuos de azúcar en las superficies del huésped. Las principales macromoléculas de la pared celular tienen una arquitectura básica similar entre especies, pero varias modificaciones, como la glicosilación, pueden contribuir a las propiedades específicas de cada cepa de los probióticos.

Algunas bacterias probióticas tienen apéndices largos en la superficie, compuestos por diferentes subunidades, conocidos como fimbrias o pili, en la figura 5, se muestra de forma esquemática las características generales de la envoltura celular de bacterias Gram Positivas.

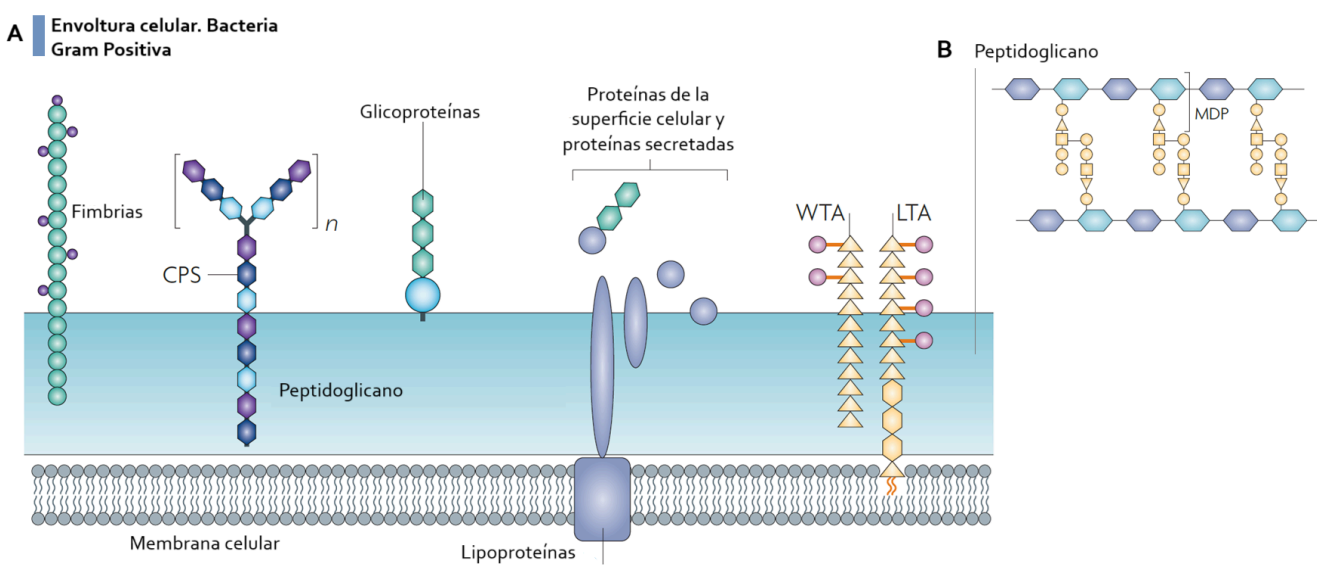


Figura 5. Envoltura celular bacterias Gram Positivas. A) Componentes que pueden integrar las envoltura celular. B) Peptidoglicano. Está constituido por cadenas de glicanos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que se unen a través de enlaces β -1,4, entrecruzados por cadenas de aminoácidos. Figura adaptada de Lebeer et al., 2010.

Como se mencionó en el apartado 2 los polisacáridos extracelulares, son moléculas a las cuales se les puede atribuir beneficios a la salud. Según su estructura, los EPS se clasifican en dos grupos: homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS)(Riaz Rajoka et al., 2020). Los primeros están compuestos por un único tipo de monosacárido, ya sea glucosa (α -glucanos y β -glucanos) o fructosa (-fructanos). Por su parte, los heteropolisacáridos, que constituyen la mayoría de los EPS producidos por bacterias ácido lácticas, están compuestos

por una cadena principal de subunidades repetidas, ramificadas o no, que consisten en tres a ocho monosacáridos, comúnmente ramnosa, fructosa, galactosa o glucosa. En algunos casos, los HePS pueden presentar modificaciones, como acetilaciones, piruvilaciones y fosforilaciones (Ruas et al., 2005; Korcz et al., 2018). Existen diferencias sustanciales en el número de enzimas y etapas involucradas en la síntesis y exportación fuera de la célula entre los HoPS y los HePS.

5.1 Peptidoglicano

Como se mencionó anteriormente, este es el componente principal de la pared celular de las bacterias Gram positivas. Está constituido por cadenas de glicanos de la unidad repetitiva disacáridica N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAMur) que se unen a través de enlaces β -1,4. Unido al grupo carboxilo del N-acetilmurámico se encuentra un péptido corto cuya secuencia es característica taxonómica de la especie. Este péptido es responsable del entrecruzamiento entre las cadenas polisacáridicas (Figura 6). En la familia Lactobacillaceae, la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica es L-alanina, ácido D-glutámico, di-aminoácido (que pueden ser lisina, asparragina o meso-diaminopimelico), D-alanina (Chapot-Chartier, 2014; Lebeer et al., 2010). Los di-aminoácidos al contener dos grupos amino pueden formar enlaces peptídicos con aminoácidos di-carboxílicos de otra cadena. Además, el D-Asn se utiliza a menudo como puente cruzado entre el D-Ala y el L-Lys, y este residuo también puede ser amidado. Aunque la mayoría de las variaciones en el peptidoglicano ocurren en los péptidos del tallo, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico pueden experimentar diferentes modificaciones, como la O-acetilación (Lebeer et al., 2010). La presencia de la O-acetilación en la N-acetilglucosamina de lactobacilos fue descrita por primera vez en 2011 en *Lcp. plantarum*. Bernard y col. demostraron que tanto MurNAc como GlcNAc están O-acetilados en esta especie y que estas modificaciones post-traduccionales del PG dependen de dos genes, denominados *oatA* y *oatB*, que codifican O-acetiltransferasas específicas. En la mayoría de los lactobacilos, D-Ala predomina en la posición cinco del PG recién sintetizado. Los residuos de D-lactato se encuentran en los lactobacilos que son naturalmente resistentes a la vancomicina, como *Lcb. casei* y *Lcp. plantarum* (Bernard et al., 2011; Lebeer et al., 2010).

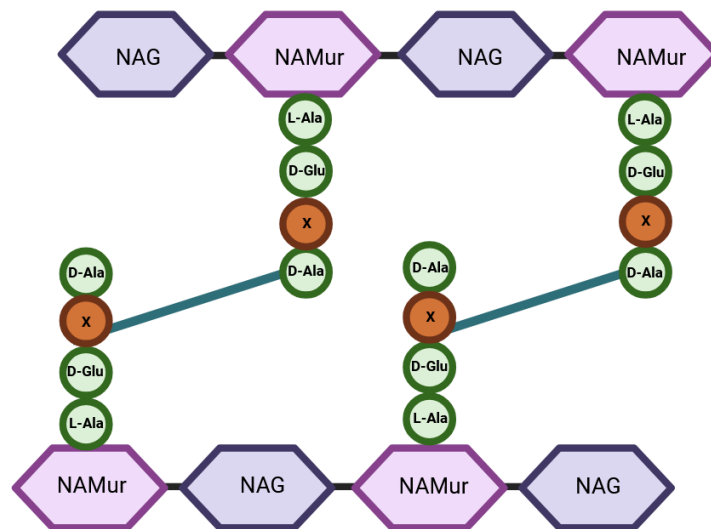


Figura 6. Detalle peptidoglicano. El peptidoglicano tiene una estructura básica similar en todas las bacterias, compuesta por cadenas de glicano con residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidos por enlaces β -1,4, que están ampliamente entrecruzados por dos cadenas laterales de péptidos unidas al N-acetilmurámico. En lactobacilos, la secuencia consenso es L-Ala/d-Glu/(I-Lys o ácido mesodiaminopimérico)/d-Ala. Editado por BioRender.com (2025)

En el PG ocurren modificaciones a lo largo del desarrollo de la célula. Su síntesis y degradación se encuentra regulada por un gran número de enzimas. Luego de su síntesis el PG es modificado incorporando grupos químicos. Entre las modificaciones descritas se encuentran: N-deacetilaciones, O-acetilaciones e incluso amidaciones de los grupos carboxilos libres de los aminoácidos constituyentes de las cadenas peptídicas. Estas modificaciones presentan consecuencias funcionales. Además, se ha reportado la importancia de estas modificaciones en bacterias patógenas para evadir la respuesta inmune del hospedador (Veyrier et al., 2013)

En las BAL, el número de O-acetilaciones varía dependiendo del género. En diferentes trabajos se ha destacado O-acetilaciones cercanas al 30% en lactobacilos. Por otro lado, la aparición de glucosamina (GlcNH_2) en el PG se debe a las N-deacetilaciones de GlcNAc . A su vez, los grupos carboxilo libres de las cadenas peptídicas que conforman el PG, pueden sufrir amidaciones. Por lo general, los aminoácidos que suelen modificarse suelen ser D-Glu, mDAP y D-Asp. En *Lc. lactis* se ha reportado una mayor amidación en la fase de crecimiento exponencial mientras que en *Lcb. casei* la misma se encuentra presente en todos los momentos del desarrollo celular

(Chapot-Chartier, 2014; Veyrier et al., 2013). Varios estudios han demostrado que inhibir las amidaciones se reduce el crecimiento bacteriano, lo que indica que el PG amidado actúa como un sustrato más eficiente para las enzimas de síntesis de PG y aquellas implicadas en la división celular. Asimismo, la ausencia de amidaciones se asocia con una mayor resistencia a antibióticos betalactámicos y una sensibilidad aumentada a la acción de lisozimas (Figueiredo et al., 2012).

5.2 Ácidos teicoicos

Los ácidos teicoicos son polímeros aniónicos, los cuales están generalmente formados por unidades repetidas poliglicerol fosfato o de poliribitol fosfato, anclados covalentemente al PG (ácidos teicoicos de la pared, WTAs) o a la membrana citoplasmática (ácidos lipoteicoicos, LTAs). Tanto los WTAs como los LTAs suelen estar sustituidos con residuos glicosídicos o ésteres de D-alanina. Pueden existir diferencias a lo largo de las cadenas y el grado de sustitución con D-alanina entre especies (Figura 7). La presencia de los ácidos teicoicos (WTA y LTA) está generalizada en bacterias Gram positivas y constituyen entre el 35-50% de la pared aunque ciertas especies bacterianas, incluyendo *Lcb. casei*, *Lcb. paracasei* y *L. rhamnosus*, parecen contener solo LTA (Allievi et al., 2019; Chapot-Chartier, 2014).

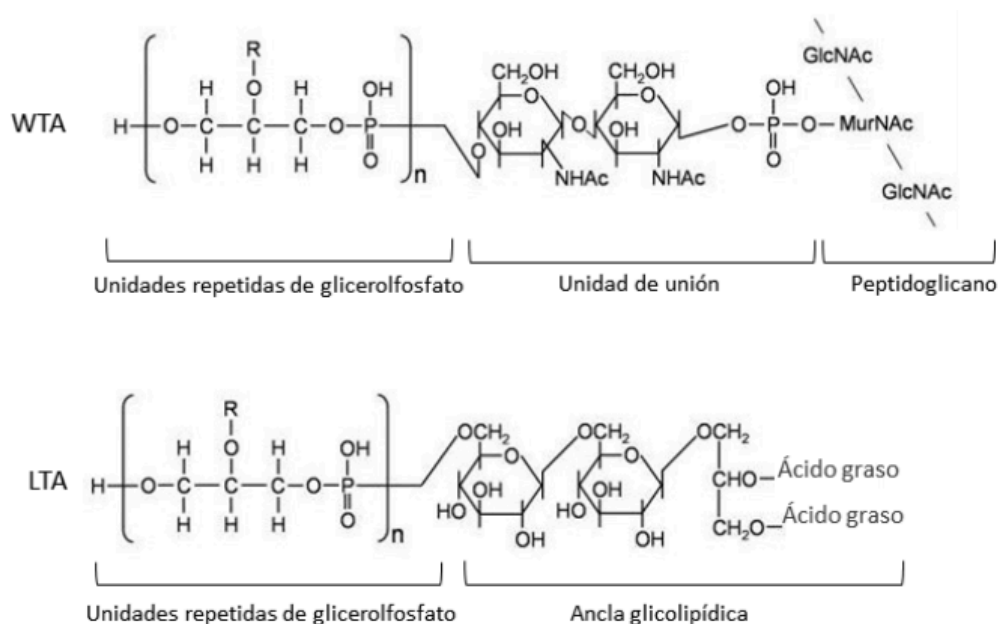


Figura 7. Estructura química de los ácidos teicoicos de pared y de los ácidos lipoteicoicos.

Figura adaptada de Shiraishi et al., 2016.

La sustitución en D-alanina está directamente relacionada con las propiedades iónicas y función de estos polímeros. Su función es mantener el ambiente iónico en particular secuestrando cationes divalentes y el gradiente de pH para sostener el potencial de membrana. La afinidad de los antibióticos catiónicos, como Nisina, por las bacterias es consecuencia de su carga positiva que garantiza afinidad por la carga negativa de la envoltura bacteriana. La incorporación de la D-alanina, con cargas positivas en los ácidos teicoicos, proporciona a las células varias ventajas adaptativas como, la formación de biopelículas o biofilm, una mejor adhesión a las células huésped y la resistencia a los péptidos antimicrobianos catiónicos (Percy & Gründling, 2014; Shiraishi et al., 2016).

Los ácidos teicoicos conforman la capa más externa (en especies que no poseen S-layer) y junto con el PG, los WTA y LTA componen una malla polianiónica que provee funciones, relacionadas con la división, porosidad y mantenimiento de un medio iónico apropiado. Mutantes deficientes en LTA de *Lactobacillus acidophilus* exhiben una morfología elongada similar a la observada cuando se crece en alta sal, y resultaron sensibles a altas concentraciones de manganeso, sugiriendo un rol de los LTA en la homeostasis iónica (Selle et al., 2017).

5.3 Proteína S-layer

Algunas especies poseen además proteínas de superficie, *Surface layer* (S-layer, por sus siglas en inglés, o proteína de capa S. En la familia *Lactobacillaceae*, la proteína de capa S se ha encontrado en varios, pero no en todos los géneros. Numerosos datos bioquímicos o funcionales han sido publicados sobre las proteínas S-layer de *Levilactobacillus brevis*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus kefir*, *Lentilactobacillus hilgardii* y en microorganismos del género *Lactobacillus* como *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus* y *L. gallinarum* (Hynönen & Palva, 2013; Sleytr, 2016; Cavallero et al., 2017; Palomino et al., 2023). Las proteínas de capa S de *Lactobacillus* caracterizadas contienen un péptido señal de 25 a 32 aminoácidos, lo que indica la secreción a través de la vía secretora general y un peso molecular de entre 25-71 kDa. Estas proteínas están enriquecidas en aminoácidos básicos e

hidrofóbicos frecuentemente exhibiendo un pI entre 9.4 a 10.4 (Malamud et al., 2019; Palomino et al., 2023). Las proteínas de capa S se consideran como arreglos monomoleculares cristalinos de una única proteína o de una glicoproteína que se auto ensamblan en una forma multimérica. Estas cubren la superficie entera de la célula representando hasta el 20% de las proteínas totales. Estas proteínas se encuentran ancladas a los ácidos teicoicos, polímeros secundarios de la envoltura y se ha propuesto que la interacción de los aminoácidos básicos de la región C-terminal de la S-layer y los polímeros secundarios de carga negativa sería responsable de mediar la unión a la pared celular (Hynönen et al., 2014; Selle et al., 2014; Fina Martin et al., 2019).

La capacidad de adherirse a regiones específicas del tracto gastrointestinal es una propiedad que las ha impulsado para ser utilizadas como vehículos para el transporte de compuestos biológicos como fármacos, anticuerpos, vacunas y enzimas. Las aplicaciones biotecnológicas que se abordarán en esta tesis implican conjugar los beneficios de las características probióticas de cepas de *Lactobacillus* con la posibilidad de exponer proteínas o péptidos bioactivos en su superficie celular en alta densidad, todo en una misma formulación, utilizando la proteína SlpA de *L. acidophilus* ATCC 4356 como proteína de anclado a la superficie celular. Como vehículos de presentación de proteínas heterólogas presentan varias ventajas: uso seguro, capacidad de sobrevivir al ambiente hostil del tracto gastrointestinal (bajo pH, alta concentración de sales biliares, resistencia a proteasas), retención de 2 a 3 días, colonización de mucosas por efectos de adhesión, baja inmunogenicidad intrínseca y propiedades adyuvantes (Matsuguchi et al., 2003; Vizoso Pinto et al., 2009; Rocha-Ramírez et al., 2017; O’Flaherty et al., 2018). La proteína SlpA es la proteína de capa S predominante en *L. acidophilus* ATCC 4356, tiene una estructura bi-modular con dos dominios funcionales bien distinguidos (figura 8): una región involucrada en el ensamblado de la proteína (N-terminal) y otra en la unión a la superficie celular (C-terminal). El dominio C-terminal de SlpA, predominantemente básico, está conformado por dos dominios SLAP (pfam 03217), recientemente incluidos en la base de Familias de Dominios de Proteínas Conservadas (<https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=397362>). El SLAP, un dominio de 60 residuos, aloja un motivo de unión a carbohidratos (CRD) y se encuentra repetido en tándem. Los dominios SLAP están presentes en diversas especies de *Lactobacillus*, incluyendo *L. kefiranofaciens*, *L. crispatus*, *L. helveticus*, *L. amylolyticus*, *L. gallinarum*, *L. acidophilus*, y *L. amylovorus* (Palomino et al., 2013; Sagmeister et al., 2024). Particularmente, en *L. acidophilus*

ATCC 4356 se ha confirmado experimentalmente que el dominio CT con ambos dominios SLAP se encuentra implicado en la interacción de SlpA con la pared celular. Este dominio explicaría la capacidad de tipo lectina de esta proteína al interaccionar con distintos componentes glicoconjugados de origen procariota (PG y LTA) y eucariota (mucinas y quitina) (Fina Martin et al., 2019).

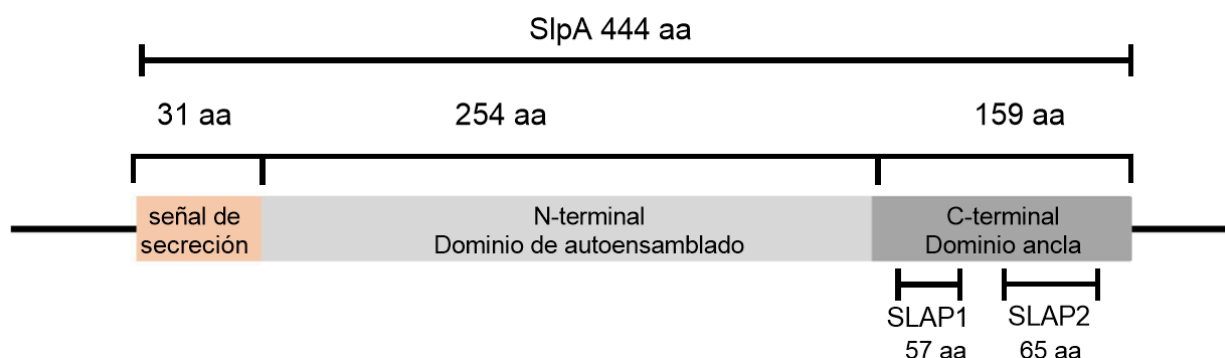


Figura 8. Dominios funcionales de SlpA de *Lactobacillus acidophilus*. Dominio N-terminal de autoensamblado y el Dominio C-terminal de anclaje, señalando los dominios SLAPs. Adaptado de Klotz & Barrangou, 2018.

La interacción entre las proteínas de capa S de *Lactobacillus* y las células epiteliales gastrointestinales activa varias vías de señalización que brindan protección al huésped al bloquear competitivamente la adhesión de bacterias patógenas de alto riesgo, como *E. coli* enteropatógeno, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Listeria monocytogenes*, entre otros. Algunas propiedades probióticas, como la adhesión, la agregación o la inhibición de patógenos, se han relacionado con la presencia de S-layers. Se ha encontrado que la proteína de capa S de *L. crispatus* previene la adhesión de patógenos potenciales como *E. coli* O175:H7. En experimentos de co-incubación de *E. coli* O157:H7 o *Salmonella typhimurium* con proteínas S-layer de *L. crispatus* ZJ001, se observó que las proteínas de capa S prevenían la adhesión de estos patógenos a células HeLa mediante un mecanismo de exclusión competitiva. Los métodos que permiten purificar proteínas de la capa S de manera nativa son diversos, y se basan en el hecho de que las Slps están asociadas con la pared celular de manera no covalente. Por lo general, las proteínas unidas a la superficie de *Lactobacillus* se extraen de bacterias intactas mediante sustitución catiónica, utilizando Li^+ (Do Carmo et al., 2018; Sleytr et al., 2014). Dado que el LiCl puede inducir toxicidad cuando se lo administra oralmente, se han abordado estrategias, más seguras que permitan sustituir el LiCl, como el NaCl (Gordillo et al.,

2020). Además de su aplicación en la prevención de trastornos del tracto gastrointestinal, también tienen otras aplicaciones, como su uso en nanopartículas debido a la capacidad de autoensamblaje de la proteína nativa y recombinante en suspensión.

5.4 Aplicaciones de proteínas de Capa S

Las proteínas de capa S, tienen un amplio espectro de aplicaciones en biotecnología, nanotecnología, nanobiotecnología y biomimética debido a su alto grado de regularidad estructural y sus propiedades de autoensamblaje en varias matrices, así como a la amplia información disponible sobre su estructura, genética, química, ensamblaje y propiedades fisicoquímicas. Las *S-layer* pueden utilizarse como matrices para la inmovilización de moléculas, como anticuerpos (Lebeer et al., 2018), alérgenos, haptenos de oligosacáridos o proteínas de interés bioquímico y biomédico (Panwar et al. 2017). También se han encontrado aplicaciones bioquímicas en los propios dominios que autoensamblan esta proteína.

El papel de las proteínas de capa S como proteínas de interés bioquímico y biomédico, se ha visto en distintos campos, como por ejemplo en el desarrollo de vacunas mucosales, destacando su potencial como transportadoras de antígenos. Esto se debe a que es posible enlazar químicamente polisacáridos o proteínas a las *S-layers*, lo que permite utilizarlas como transportadoras de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune, gracias a su adyuvancia intrínseca y a su capacidad para exhibir proteínas y epítopes en su superficie (Bingle et al., 1997; Umelo-Njaka et al., 2001).

En particular, se han utilizado las proteínas de capa S como proteínas de anclaje en BAL recombinantes, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Qin et al., 2014; O'Flaherty & Klaenhammer, 2016). Estos microorganismos han sido utilizados como vehículos vivos para exhibir antígenos, proteínas funcionales o para llevar ADN a nivel mucosas, específicamente, por vía intranasal, oral o sobre la superficie de mucosas genitales. Predominantemente se usan modelos animales y estos estudios también se han comenzado a ensayar en humanos dentro del área clínica (Daniel et al., 2011; Kawana et al., 2014). Sin embargo, en estos abordajes se plantea el uso de cepas genéticamente manipuladas con DNA recombinante, características que afectaría el estatus GRAS de las mismas.

En este sentido, y con el fin de evitar el empleo de organismos genéticamente modificados (OGM), han cobrado relevancia las estrategias biotecnológicas basadas en el anclado exógeno de proteínas de interés sobre la superficie celular de BAL (Hu et al., 2011; X. Zhang et al., 2016).

En esta línea, se ha avanzado en la exploración de diversas proteínas *S-layer* para ser utilizadas como herramientas de anclaje para la exhibición de proteínas heterólogas sobre la superficie de BAL genéticamente no modificadas. Por lo tanto, la utilización de proteínas *S-layer* fusionadas a antígenos derivados de diferentes patógenos y posteriormente ancladas a cepas probióticas representa una estrategia promisorio para el desarrollo de plataformas vacunales. Esta estrategia resulta especialmente atractiva, ya que los lactobacilos poseen la capacidad de persistir en el tracto gastrointestinal, adherirse al epitelio intestinal, modular la respuesta inmune y, además, ofrecen una ventaja significativa en términos de seguridad respecto al uso de patógenos vivos atenuados. Un ejemplo de esto, se encuentra en el trabajo realizado por Uriza y colaboradores, donde fusionaron un antígeno quimérico EITH7, derivado de proteínas asociadas a cepas productoras de toxina Shiga, al dominio dSLP-A de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 mediante un sistema de expresión heterólogo. Se evaluó si esta fusión se unía a la pared celular de *L. acidophilus* con el objetivo de generar una plataforma de vacunación oral. La proteína recombinante se purificó por afinidad y luego se incubó con cultivos de *L. acidophilus* para anclar el antígeno quimérico a la superficie bacteriana. *L. acidophilus* decorado con EITH7 se administró oralmente a ratones BALB/c. Mediante ELISA se midieron los títulos de anticuerpos específicos anti-EITH7 en suero y heces. Los animales que recibieron la bacteria decorada presentaron títulos significativamente más altos y controlaron con mayor eficacia una infección experimental por STEC (*Escherichia coli* productora de toxina Shiga), en comparación con los ratones que recibieron *L. acidophilus* sin decoración. Estos resultados demuestran que *L. acidophilus* decorado con el antígeno a través del dominio dSLP-A, puede emplearse como una plataforma de inmunización mucosal protectora (Uriza et al., 2020)

Además de la exhibición de antígenos, pueden exhibirse péptidos funcionales o proteínas de interés a través de la proteína de capa S. Se ha descrito la exhibición de la organofosfato hidrolasa en la superficie de células bacterianas como estrategia de biorremediación, los autores han propuesto, que al combinar la enzima con la proteína *S-layer* puede mejorar estabilidad y actividad (S. Y. Lee et al., 2003). Además del dominio de anclaje de proteínas *S-layer*, se han estudiado otros dominios proteicos con la finalidad de unir de manera trans, péptidos o proteínas sobre la superficie de Bacterias Gram Positivas, como por ejemplo la principal autolisina AcmA (proteína de envoltura celular) de *Lactococcus lactis*, con tres dominios LysM y el dominio WxL (Brinster et al., 2007; Hu et al., 2010; Zadravec et al., 2015).

El dominio LysM ha sido observado en numerosas proteínas, tanto procariota como eucariotas (Bateman & Bycroft, 2000; Buist et al., 2008), incluso ha sido observado en Archeas (Brinkman et al., 2002; Desvaux et al., 2006; Song et al., 2013; Nguyen-Duc et al., 2013). Este dominio puede unirse al peptidoglicano en bacterias, a la quitina en eucariotas y a glicoproteínas virales (Buist et al., 2008; Gust et al., 2012). La unión de LysM toma lugar preferentemente en aquellos sitios de crecimiento y división celular donde ocurre la síntesis *de novo* de peptidoglicano.

El dominio WxL se ha encontrado en proteínas de superficie de *Lactiplantibacillus plantarum* (Kleerebezem et al., 2003) y en otras bacterias Gram Positivas con bajo contenido de G+C como *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactocaseibacillus casei* y *Enterococcus faecium*. A diferencia de las proteínas localizadas en el citoplasma o liberadas al extracelular, las proteínas exhibidas en la superficie bacteriana pueden ser obtenidas por BAL sin la intervención de modificaciones genéticas. Entre las alternativas para evitar el uso de organismos genéticamente modificados se recurre al uso de un microorganismo secundario y productor de la proteína de interés fusionada al dominio de anclado elegido. Posteriormente, esta proteína es purificada y anclada de forma exógena sobre la superficie de las BAL (Gordillo 2020).

En la siguiente tabla, se muestra un resumen de los sistemas en los que se han usado distintos dominios como *carriers* y *E. coli* como principal célula productora para exponer distintas proteínas heterólogas sobre la superficie de BAL y sus correspondientes aplicaciones.

TABLA 1. Exposición de proteínas en superficie en BAL vivas sin modificación genética (Mao et al. 2016)

Célula Huésped	Ancla	Célula productora	Proteína Expuesta	Aplicación	Referencia
<i>Lactobacillus</i>	AcmaA	<i>E. coli</i>	α -Amilasa	Bioconversión	(Tarahomjoo et al., 2008)
		<i>E. coli</i>	CAV VP1	Vacunación	(Moeini et al., 2011)
		<i>E. coli</i>	PapG	Vacunación	(Ashrafi et al., 2015)
		<i>Lc. lactis</i>	MSA2	Ensayo de binding	(Steen et al., 2003)
		<i>Lc. lactis</i>	MSA2	Vacunación	(Moorthy & Ramasamy, 2007)
	MurO	<i>E. coli</i>	GFP/ β -galactosidasa	Ensayo de binding	(Xu et al., 2011)
	WxL	<i>E. faecalis</i>	NucB	Ensayo de binding	(Brinster et al., 2007)
	SlpB	<i>E. coli</i>	GFP	Ensayo de binding	(Hu et al., 2010)
	S-layer	<i>E. coli</i>	HGFP	Ensayo de binding	(Smit et al., 2001)
<i>Lactococcus</i>	AcmaA	<i>E. coli</i>	A1/A3 región	Vacunación	(Raha et al., 2005)
		<i>E. coli</i>	α -Amilasa	Bioconversión	(Tarahomjoo et al., 2008)
		<i>Lc. lactis</i>	DARPinS	Nueva droga	(Zadravec et al., 2015)
		<i>E. coli</i>	EV71 VP1	Vacunación	(Kalyanasundram et al., 2015)
		<i>E. coli</i>	CjaA/CjaD	Vacunación	(Varma et al., 2013)
		<i>Lc. lactis</i>	MSA2	Ensayo de binding	(Kobierecka et al., 2015)
		<i>Lc. lactis</i>	MSA2	Vacunación	(Steen et al., 2003)
	Lyb5	<i>E. coli</i>	GFP	Ensayo de binding	(Hu et al., 2010)

	AcmD	<i>Lc. lactis</i>	MSA2/GFP	Ensayo de binding	(Visweswaran et al., 2013)
	SlpB	<i>E. coli</i>	GFP	Ensayo de binding	(Hu et al., 2010)
	LysA2	<i>E. coli</i>	HPV-16 E7	Vacunación	(Ribelles et al., 2013)
<i>Enterococcus</i>	AcmA	<i>E. coli</i>	IBV-S1	Vacunación	(Lin et al., 2012)
		<i>Lc. lactis</i>	MSA2	Ensayo de binding	(Steen et al., 2003)
	WxL	<i>E. faecalis</i>	NucB	Ensayo de binding	(Brinster et al., 2007)
<i>Streptococcus</i>	AcmA	<i>Lc. lactis</i>	MSA2	Ensayo de binding	(Steen et al., 2003)
	WxL	<i>E. faecalis</i>	NucB	Ensayo de binding	(Brinster et al., 2007)

Además de BAL vivas también pueden utilizarse, bacterias muertas como partículas, conocidas como BLP, por sus siglas en inglés (*non living Bacterial-Like Particles*). Comparado con las BAL vivas, las BLP tienen una mayor capacidad de unión cuando las partículas son hervidas en ácido tricloroacético (TCA), seguido de un lavado y neutralización (Steen et al., 2003). El TCA remueve los polímeros secundarios de la pared celular, logrando un peptidoglicano más accesible. Las BLP desnudas y asociadas a proteínas, son altamente estables a temperatura ambiente. En el 2015 Kobierecka y col. utilizaron esta plataforma con el fin de hacer vacunas orales. Ellos utilizaron como ancla el dominio LysM con el fin de exhibir en la envoltura de *Lactobacillus salivarius* antígenos de *Campylobacter jejuni* para desarrollar vacunas contra la campilobacteriosis (Kobierecka et al., 2015). Existen diversos ejemplos en literatura donde se muestra su uso en cepas de *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.* entre otras (Mao, Wu, et al., 2016), sin embargo, la ventaja de usar bacterias vivas sobre las BLP, es que en el caso de las BAL, trabajar con cepas probióticas, permite aprovechar las características y beneficios propios de las cepas, además de características adicionales brindadas por la proteína o péptidos en exhibición.

Otras proteínas que se han postulado como proteínas de anclaje para la exhibición de proteínas heterólogas en la superficie de Bacterias Ácido Lácticas son las endolisinas de bacteriófagos (Brinster et al., 2007; Kashige et al., 2000; Ribelles et al., 2012). Antes de abordar sobre las aplicaciones de las endolisinas se introducirá a los bacteriófagos.

6. Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan específicamente bacterias. Fagos y bacterias han coevolucionado juntos, lo que optimiza su propagación en la célula y su mecanismo de liberación. Son las entidades biológicas más abundantes en la Tierra. Los fagos pueden infectar a las bacterias por medio de un ciclo de infección lítico, lisogénico o realizando una combinación de ambos. En un ciclo de infección lisogénico, el fago puede integrar su genoma al de la bacteria que infecta, formando lo que se conoce como profago. El mismo puede permanecer en la bacteria o en determinadas circunstancias el profago, puede activar un ciclo de infección lítico (Figura 9).

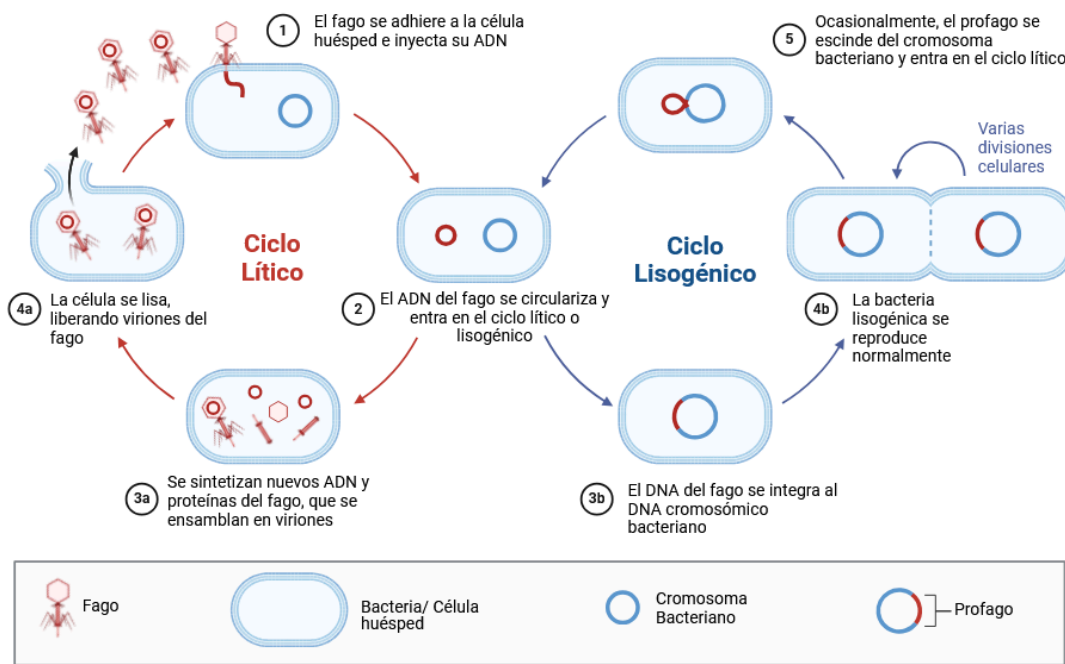


Figura 9. Ciclos lítico y lisogénico. Adaptado de Atluri & Yang, 2023. Editado de “*Lytic and Lysogenic Cycle*”, por BioRender.com (2025).

Los fagos pueden infectar específicamente y eliminar rápidamente a sus hospedadores bacterianos durante sus ciclos de vida líticos (Clokie et al., 2011; Fischetti, 2018). En un ciclo de infección lítico inyecta su material genético en las bacterias, utilizando la maquinaria celular del huésped para crear nuevas partículas virales. Tras replicarse dentro de las células bacterianas, los fagos necesitan salir de los hospedadores bacterianos para liberar los viriones progenie

ensamblados. Los fagos han desarrollado un sistema lítico para digerir la pared celular bacteriana, provocando así la lisis bacteriana, esto lo realizan a través de un sistema de proteínas denominado Holina-Endolisina (Fischetti, 2010). Las endolisinas de fagos son moléculas altamente eficientes que los fagos han utilizado durante miles de millones de años con este propósito exacto. Las endolisinas acceden al peptidoglicano a través de lesiones en la membrana formadas por proteínas denominadas holinas; degradan la integridad de la pared celular desde el interior de la bacteria (Figura 10). (Vukov et al., 2003).

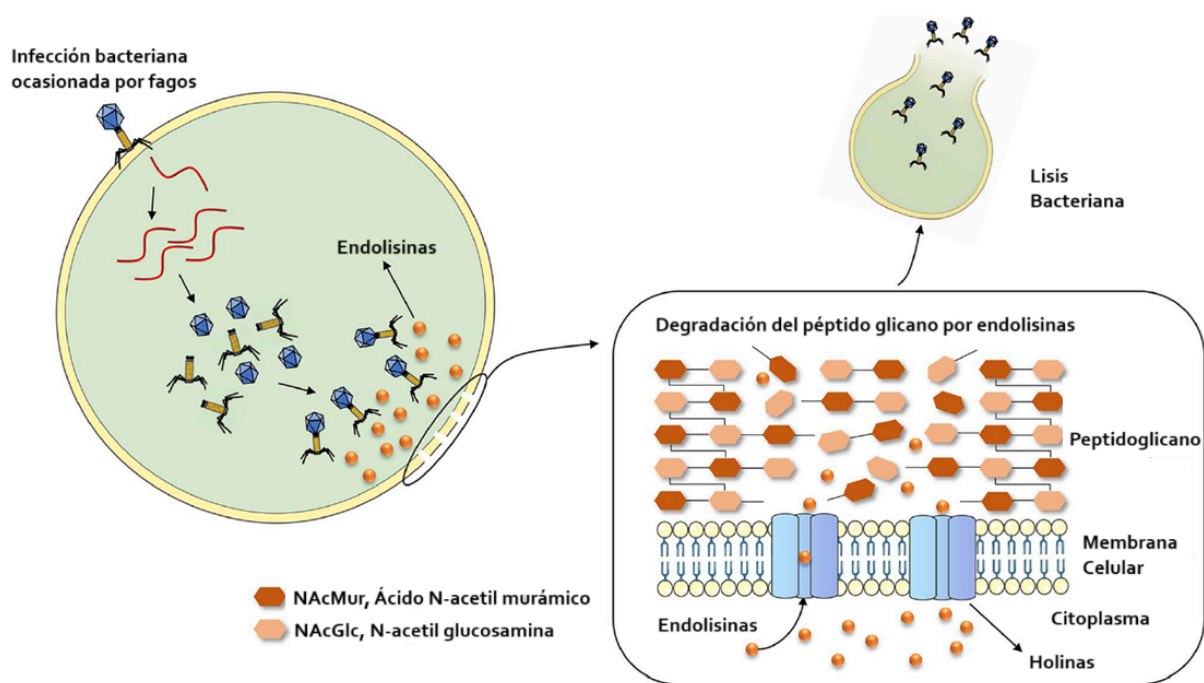


Figura 10. El papel de las endolisinas y holinas en el proceso de infección de un fago en una bacteria Gram positiva. Tras la replicación dentro de la célula bacteriana, la nueva progenie utiliza un sistema lítico que incluye endolisinas y holinas para destruir la integridad de la pared celular desde el interior de la bacteria y liberar los viriones fagos ensamblados. (H. Liu et al., 2023)

Las endolisinas normalmente tienen una estructura modular que presentan al menos dos dominios, el dominio catalítico con actividad lítica (EAD, por sus siglas en inglés *enzymatic activity domain*) y el otro es el dominio de unión a pared (CBD, por sus siglas en inglés, *cell wall binding domain*). El dominio catalítico actúa sobre el peptidoglicano produciendo la hidrólisis de

la pared, ya sea actuando sobre los enlaces de los azúcares del peptidoglicano o ejerciendo una actividad de endopeptidasa, con la función de alterar la presión osmótica de la membrana permitiendo la salida de la progenie viral hacia afuera. El dominio de *binding* o unión a la pared suele ser específico entre fago-bacteria.

6.1 Fagos de BAL

La industria láctea, ha tenido que enfrentar los problemas ocasionados por fagos durante muchos años y ha recurrido a una variedad de enfoques prácticos para controlarlos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos extensivos, la infección por fagos en cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas sigue siendo la causa más común de fermentaciones lentas o incompletas en la industria láctea incluso algunas estimaciones asumen que los bacteriófagos son los principales responsables de las pérdidas económicas en fábricas afectando entre el 0,1% y el 10% de los fermentos lácteos (Moineau y Lévesque, 2005). En 1965, a partir de una fermentación anormal de la bebida Yakult en Japón, se aisló el primer fago de *Lcb. casei* denominado J-1 (Hino y Ikebe, 1965). En la elaboración de esta leche fermentada, se empleó a la cepa *Lcb. casei* Shirota como iniciadora. El fago PL-1 fue aislado dos años más tarde cuando se empleaba una nueva cepa resistente a J-1 (Watanabe et al., 1970). Este fago (PL-1) tiene reconocimiento específico a la envoltura de *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Ambos fagos están serológicamente relacionados. J-1 y PL-1 fueron caracterizados extensivamente por diferentes grupos en Japón (Sable & Lortal, 1995). La endolisina del fago PL-1 ha sido caracterizada con actividad N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa de potencial uso biotecnológico (Kashige et al., 2000). Aunque J-1 y PL-1 se aislaron en los años '60 y se estudiaron por décadas, sus secuencias genómicas recién estuvieron disponibles en el año 2014 (Dieterle et al., 2014), lo cual es de importancia no solo para la clasificación de los mismos sino también para entender su evolución y poder realizar estudios más profundos.

La primera condición para que un fago pueda infectar a la bacteria es la presencia de receptores específicos en la superficie de la célula huésped. El primer paso en la infección es la adsorción. Como se mencionó anteriormente, las paredes de las bacterias Gram positivas consisten en una capa gruesa de peptidoglicano decorada con varias proteínas y polisacáridos. Para los fagos como PL-1, la cola es el componente central en la adsorción, particularmente una estructura denominada gp-16. Se realizaron estudios con fusiones de GFP-gp16, donde se

observó la especificidad de esta partícula a la envoltura de *Lcb. paracasei*. Luego se realizaron ensayos de competencia con distintos azúcares presentes en la envoltura bacteriana, donde se observó una disminución significativa de la proteína GFP-gp16. Los resultados en conjunto, fueron claves para demostrar que el fago PL-1 reconoce azúcares, particularmente L-ramnosas presente en los CWPS de los lactobacilos (Dieterle et al., 2014). En general, la adsorción presenta una primera etapa reversible de unión a los receptores a través de las fibras de la cola y un adecuado posicionamiento de la placa basal. Luego de los re-arreglos convenientes en la placa base, puede existir una interacción irreversible entre proteínas de la cola y los receptores bacterianos (Kutter et al., 2005).

6.2 Endolisinas de fagos de BAL y sus aplicaciones

Las endolisinas de bacteriófagos son enzimas hidrolíticas de peptidoglicano que el virus emplea para lisar la célula huésped al final de su ciclo de replicación. En biotecnología, estas proteínas han cobrado gran relevancia como antibacterianos de nueva generación, debido a su capacidad para reconocer e hidrolizar de manera específica la pared celular bacteriana.. Además, se han realizado estudios para aplicar endolisinas en el control de patógenos en mucosas y en la eliminación de biofilms (Pastagia et al., 2013). En los últimos años, el interés por estas enzimas se ha diversificado según el dominio funcional que se emplee, con el objetivo de aprovechar sus propiedades para distintas aplicaciones biotecnológicas. La ingeniería modular de endolisinas permite recombinar sus dominios para ajustar o mejorar su actividad. En el caso de Schmelcher y colaboradores, tomaron dos endolisinas de fagos de *Listeria* (PlyPSA y Ply118) y separaron sus dominios catalíticos (EAD) de los de unión al peptidoglicano (CBD). Al combinar el dominio catalítico de Ply118 con el dominio de unión de PlyPSA (EAD118–CBDPSA), obtuvieron una enzima cuya capacidad de lisar *Listeria* era hasta tres veces superior a la de cualquiera de las proteínas originales. Además, realizaron otras fusiones donde observaron un incremento de la afinidad por la pared celular en unas 50 veces, y las quimeras con dos CBD mostraron mejor actividad en condiciones de alta fuerza iónica. En conjunto, estos resultados demuestran que mezclar y combinar dominios catalíticos y de unión extiende tanto la potencia lítica como el rango de cepas reconocidas por estas enzimas (Schmelcher et al., 2011). Se puede observar, que generalmente las aplicaciones relacionadas a la detección de patógenos y exhibición de péptidos han sido principalmente enfocadas utilizando el dominio

CBD (Rodríguez-Rubio et al., 2016) mientras que dada la alta especificidad de estas proteínas y su estrecho espectro de acción, la actividad lítica alojada en el dominio N-terminal ha sido pensada para controlar contaminaciones de lactobacilos en sistemas de fermentación (Roach et al., 2013). En la figura 11 se muestran las principales aplicaciones de las endolisinas de los fagos.

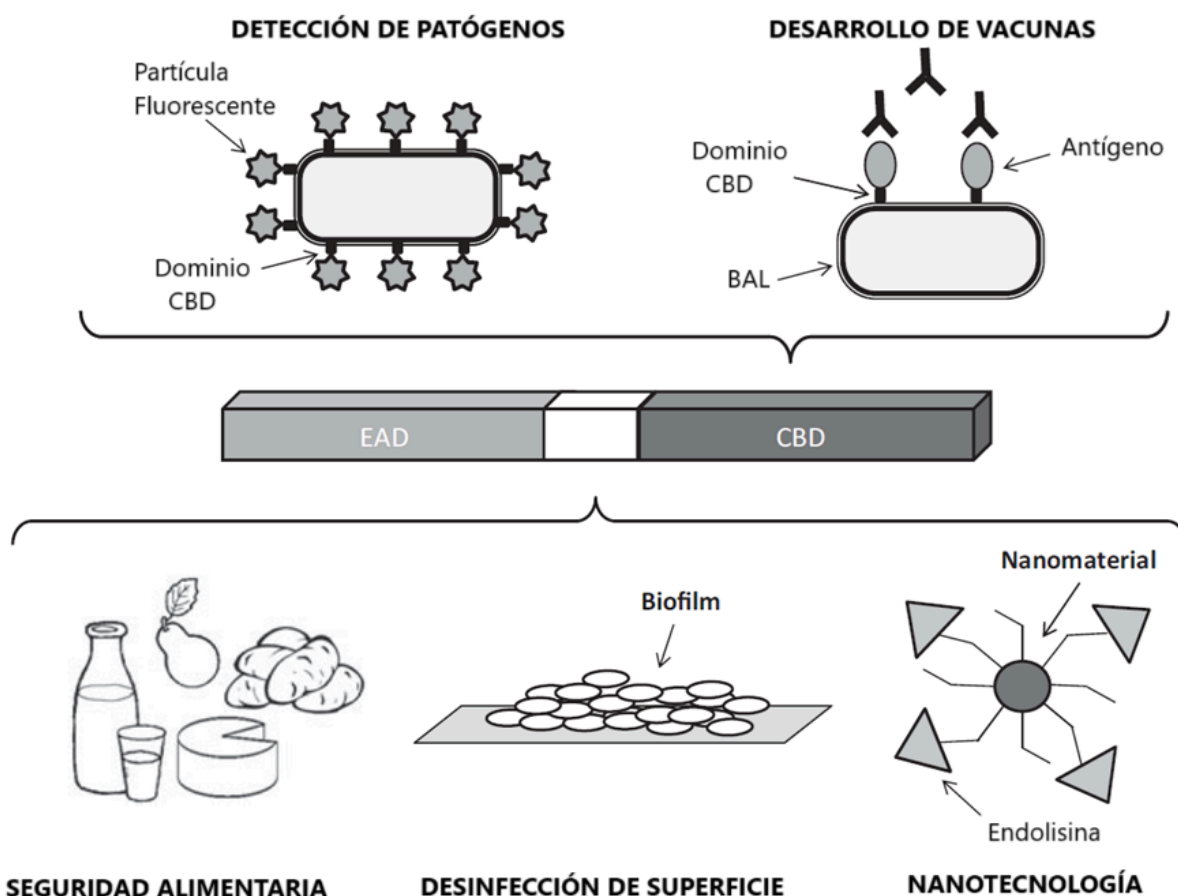


Figura 11. Principales aplicaciones biotecnológicas de las proteínas líticas de fagos. Se indica la estructura modular de estas proteínas (EAD = dominio enzimáticamente activo, CBD = dominio de unión a pared). El desarrollo de vacunas y la detección de patógenos se ha basado principalmente en el CBD de las proteínas líticas, mientras que para la seguridad alimentaria, la desinfección de superficies y aplicaciones en nanotecnología se han utilizado las proteínas completas. Adaptado de Rodríguez-Rubio et al. 2016

Recientemente, el empleo del dominio de unión a pared celular de las endolisinas de fagos de BAL ha cobrado relevancia como novedosos sistemas de anclaje no covalentes. Como se ha

mencionado previamente, su gruesa pared de peptidoglicano, junto con su estatus GRAS, posiciona a las BAL como candidatas ideales para exhibir péptidos o proteínas heterólogas en alta densidad sobre su superficie a través de estos dominios. En este contexto, dicha estrategia representa una alternativa prometedora para la presentación directa de proteínas con fines terapéuticos o industriales, sin requerir el uso de organismos genéticamente modificados, lo que contribuye a una mayor seguridad, aceptación regulatoria y reducción de costos. Aunque la biología, el genoma y el mecanismo lítico del fago PL-1 han sido estudiados en profundidad, debido a que este fago es capaz de infectar cepas comerciales (Dieterle et al., 2014; Sechaud et al., 1988; Watanabe et al., 1970), el dominio CBD de su endolisina nunca ha sido evaluado como módulo de anclaje para la exhibición de proteínas. En este contexto, uno de los objetivos de la presente tesis es llevar a cabo la caracterización funcional de dicho dominio como sistema de anclaje en la superficie de bacterias ácido lácticas.

Se pueden encontrar distintos ejemplos del uso de otras endolisinas para tales fines, como por ejemplo el gen de lisina (lysA2) del bacteriófago A2 de *Lactocaseibacillus casei* fue clonado y expresado en *Escherichia coli*. LysA2 es una endopeptidasa cuya actividad se ha demostrado sobre la envoltura de distintas cepas como *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*, cuyas paredes celulares fueron sustratos para la enzima. La unión específica de LysA2 a la pared de estas bacterias es mediada por su porción C-terminal, no requiere el dominio catalítico N-terminal para el reconocimiento y es estable, ya que al menos 88% de las moléculas permanecieron unidas a *Lcb. casei* después de 3 días en buffer fosfato a 4°C. La enzima actúa como monómero, es activa en valores de pH entre 4 y 6, y a temperaturas de 18°C a 50°C, sin necesidad de cationes divalentes. Además, mostró una alta resistencia a la incubación en valores extremos de pH, pero se inactivó progresivamente a 50°C y temperaturas superiores. Se ha demostrado que LysA2 es bactericida, reduciendo la viabilidad de cultivos de *Lcb. casei* al 1% en 10 minutos bajo las condiciones estándar utilizadas para el ensayo enzimático (Ribelles et al., 2012). Este mismo grupo, continuó sus estudios con la lisina A2 y en el 2013 utilizaron el dominio de unión celular de A2 al cual fusionaron con la oncoproteína E7, ya que esta se considera un buen candidato antigénico para el desarrollo de nuevas vacunas terapéuticas contra el cáncer de cuello uterino. En su estudio utilizaron bacterias ácido lácticas no modificadas genéticamente las cuales exhiben E7, a través del dominio CBD de la lisina del fago A2 de *Lactocaseibacillus casei*. Se validó la versatilidad de este sistema al investigar la estabilidad de E7 en la superficie de *Lc. lactis* y *Lcb. casei*, dos especies principales de BAL.

Además, se demostró el uso exitoso de estas BAL exhibiendo el antígeno E7 como una vacuna mucosal viva en ratones. En conjunto, estos hallazgos resultan de gran relevancia dado que validan el potencial de utilizar BAL no modificadas genéticamente para una inmunoterapia mucosal de bajo costo contra el cáncer de cuello uterino relacionado con HPV en humanos. (Ribelles et al., 2013).

En esta misma línea de investigación, se ha identificado otro ejemplo relevante de endolisina aplicada como sistema de anclaje en BAL, representado por la endolisina Lyb5 del fago PYB5. La endolisina Lyb5, la cual tiene reconocimiento a la envoltura de *Lactobacillus fermentum*, mostró un amplio espectro lítico contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Para investigar el potencial de Ly5C (Dominio Carboxilo terminal de la endolisina Lyb5), en la exhibición en superficie, se fusionó con la proteína fluorescente verde (GFP) en su N-terminal y C-terminal, las proteínas de fusión resultantes se expresaron en *Escherichia coli*. Luego de mezclarlas *in vitro* con varias células, se observó que la GFP se exhibió exitosamente en las superficies de *Lactococcus lactis*, *Lcb. casei*, *Lb. brevis*, *Lcp. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* y *Streptococcus thermophilus*. Estos hallazgos han validado el uso de Ly5C como un novedoso dominio de anclaje para el desarrollo de sistemas de exhibición en superficie en bacterias ácido lácticas (Hu et al., 2010).

A la hora de exponer proteínas o péptidos en la superficie bacteriana mediante dominios CBD u otros dominios potenciales de anclaje, resulta fundamental no solo conocer el blanco molecular de unión en la envoltura celular sino también definir el espectro de aplicación para cada sistema. Asimismo, es crucial evaluar estrategias que permitan optimizar la eficiencia de exhibición del dominio seleccionado. Una de estas estrategias puede consistir en inducir modificaciones en la envoltura, como ocurre cuando las BAL se cultivan en condiciones de alta salinidad, lo cual puede aumentar la capacidad de unión del dominio. A continuación se abordarán los cambios a nivel de envoltura de las BAL como respuesta al estrés osmótico.

7. Estrés osmótico y modificaciones en envoltura de BAL

A menudo, las BAL suelen estar expuestas a condiciones ambientales adversas, que pueden ser factores de estrés. Como cepas probióticas, se enfrentan al ambiente adverso (bajo pH, presencia de sales biliares, enzimas proteasas) propio del estómago, cuando se los emplea para la fermentación de alimentos, suelen enfrentar estrés térmico, ya que en el proceso de

pasteurización de las materias primas se utilizan altas temperaturas. En sus variadas aplicaciones en la industria alimenticia, estas especies también pueden ser expuestas a un estrés osmótico debido al agregado de sal y/o azúcar utilizado en la producción y maduración de quesos, fermentación de carne y en el proceso de elaboración del yogur.

Por definición el estrés osmótico es el aumento o la disminución en la fuerza osmótica del ambiente de un organismo; una respuesta al estrés osmótico es el conjunto de procesos adaptativos activos que suceden en una célula en oposición al cambio en la osmolaridad. Es una de las perturbaciones ambientales más adversas para un microorganismo, que puede causar una disminución en la tasa de crecimiento o la supervivencia y afectar las actividades metabólicas (Poolman et al., 2002). Las BAL como otras bacterias gram positivas, evolucionaron mecanismos de sensado y resistencia de estrés que le permiten tolerar los cambios ambientales. La respuesta al estrés depende de la expresión coordinada de genes que pueden alterar diferentes procesos celulares, como la división celular, metabolismo del ADN, composición de la membrana, transporte, actividad proteolítica, etc., pero que de una forma concertada mejoran la tolerancia frente al estrés. La envoltura bacteriana constituye la primera barrera en detectar los cambios ambientales. La membrana citoplasmática de las bacterias constituye una barrera eficaz contra el pasaje de la mayoría de los solutos del medio y los metabolitos presentes en el citoplasma. Para sobrevivir al estrés osmótico, las células necesitan adaptarse acumulando solutos compatibles específicos en condiciones hiperosmóticas y liberarlos bajo una condición hipoosmótica. Los principales solutos descritos son iones como el K^+ ; aminoácidos (glutamato, prolina), derivados de aminoácidos (péptidos, aminoácidos N-acetilados), aminas cuaternarias (glicin-betaína, carnitina), hidratos de carbono (sacarosa, trehalosa) y tetra-hidro-pirimidinas (ectoínas) (Allievi et al., 2019). La estabilidad de las membranas celulares desempeña un papel muy importante en la adaptación a diferentes tipos de estrés. En condiciones de estrés hiperosmótico se produce un aumento en la hidrofobicidad de la pared de lactobacilos. En las bacterias Gram positivas las moléculas que confieren hidrofobicidad están relacionadas con polímeros externos como los ácidos lipoteicoicos y las proteínas de envoltura. Los cambios inducidos en los perfiles lipídicos en la membrana celular probablemente constituyen una de las principales respuestas fisiológicas de las células para la supervivencia en el tracto gastrointestinal, por ejemplo en *Lactobacillus reuteri* se observaron cambios en el perfil de lípidos cuando fue sometido a un estrés por sales biliares. Por otro lado, en *Lcb. casei* se han descrito modificaciones de la pared y tamaño

celular cuando se crece a la bacteria en un medio con alto contenido de sal. Este aumento significativo del tamaño celular se ha correlacionado con un crecimiento más lento cuando fue expuesto a un estrés salino respecto al crecimiento en condiciones control (Piuri et al., 2003, 2005).

Palomino y colaboradores (2013) informaron que cuando *Lcb. casei* BL 23, es crecida en un medio con 0,8 M de NaCl, provoca modificaciones en su envoltura celular, se observó que *Lcb. casei* BL23 tiene una mayor capacidad para formar biopelículas y para unir cationes en condiciones de alta salinidad, respecto a cuando crece en su condición control. Este comportamiento se correlacionó con modificaciones de las propiedades de la superficie que involucran a los ácidos teicoicos, los cuales son componentes importantes de la pared celular. En estas condiciones de alta salinidad, *Lcb. casei* BL23 produce una menor cantidad del polímero de la pared celular ácido lipoteicoico (LTA), y este polímero aniónico presenta una longitud media de cadena más corta y un menor nivel de sustitución con D-alanina. Por lo tanto, se propuso un modelo alternativo de envoltura frente a respuesta bajo condiciones de estrés por alta salinidad (Figura 12). Realizaron un análisis de los niveles de transcripción del operón *dltABCD*, el cual codifica las enzimas necesarias para la incorporación de D-alanina en los polímeros aniónicos, y este mostró una reducción de 16 veces en los niveles de ARNm, lo que es consistente con una disminución de las sustituciones de D-alanina en el LTA. Además, se observó una reducción de 13 veces en los niveles de transcripción del gen *LCABL_09330* el cual codifica una putativa LTA sintasa. Por otro lado, demostraron que *LCABL_09330* es una verdadera LTA sintasa (*ItaS*) en *L. casei* BL23, para ello el dominio enzimático fue clonado y expresado en *E. coli*. La proteína purificada fue capaz de hidrolizar el lípido de membrana fosfatidilglicerol como se espera de una enzima LTA sintasa, y por lo tanto *LCABL_09330* fue renombrado como *ItaS* (Palomino et al., 2013).

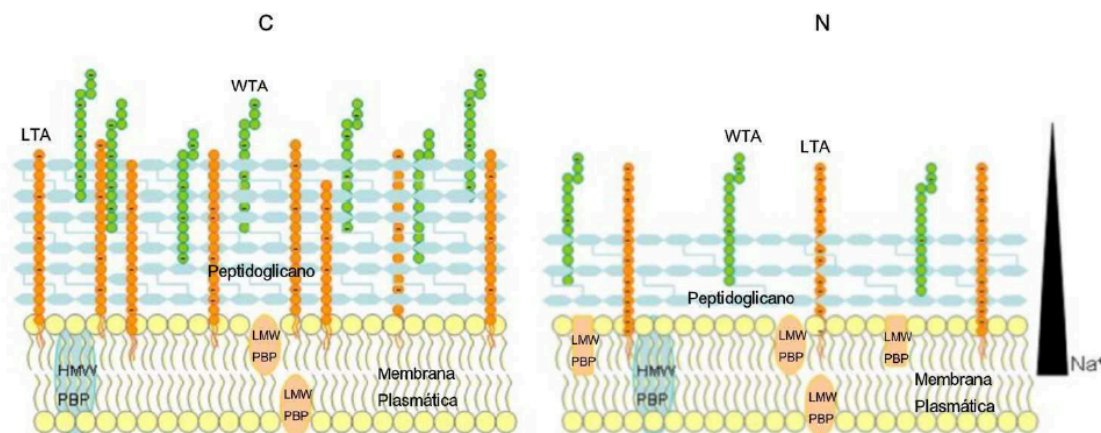


Figura 12. Esquema comparativo de envoltura de *Lcb. casei* BL23 en condición C (Control) y N (Estrés osmótico con NaCl). Los signos negativos en los polímeros hacen referencia al nivel de D-alanilación de los mismos. La barra triangular lateral indica el gradiente de eliminación de iones Na^+ . Adaptado de Palomino et al. 2013.

Otro interrogante importante es qué ocurre en la envoltura bacteriana durante la adaptación al estrés osmótico en aquellas cepas que presentan capa S. En *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, se ha documentado que las cantidades de las proteínas predominante (SlpA) y auxiliar (SlpX) de la capa S se ven fuertemente influenciadas por la fase de crecimiento y por condiciones de alta salinidad (0,6 M NaCl). En este contexto, se observaron cambios en la expresión génica: los niveles de ARNm de los genes *slpA* y *slpX* aumentaron en función de la fase de crecimiento y de la presencia de sal. Asimismo, se evidenció una modificación en el perfil de proteínas de la capa S en respuesta al NaCl, dependiente de la etapa de crecimiento. Mientras que en condiciones control la proteína auxiliar SlpX representaba menos del 10 % del total de proteínas de la capa S, bajo condiciones de alta salinidad su proporción aumentó hasta alcanzar casi el 40 % en fase estacionaria. Se documentó una reducción en el grosor de la pared celular, así como en el contenido de peptidoglicano y de ácido lipoteicoico en *L. acidophilus*, en comparación con una especie que no produce capa S, como *Lactobacillus casei*. Además, se detectó una mayor liberación de proteínas de la capa S al sobrenadante en fase estacionaria en medios con alta concentración salina (Palomino et al., 2016). Este hallazgo resulta relevante al momento de explorar estrategias de decapado alternativas al tratamiento con LiCl. En 2020, se evaluó si el crecimiento bajo condiciones de estrés osmótico puede utilizarse como una estrategia para deplecionar la capa S en cepas de *Lactobacillus acidophilus*

ATCC 4356. Además, se analizó cómo afecta el crecimiento y un posterior decapado con este agente estresante, proponiéndolo como una alternativa más segura al uso de LiCl (Gordillo et al., 2020). Los cambios inducidos en la envoltura bacteriana como parte del proceso de adaptación al estrés osmótico resultan de particular interés al considerar estrategias fisiológicas de remodelado superficial orientadas a optimizar la capacidad de anclaje en las BAL. Por ello, en esta tesis se analizará cómo estas modificaciones impactan en la eficiencia de unión de los dominios de anclaje en la superficie de BAL y en la aplicación del sistema desarrollado.

8. Aplicación del sistema: exhibición de β -galactosidasa

En los apartados anteriores se han descrito distintos dominios con capacidad de unirse a la envoltura bacteriana, destacándose en particular el dominio carboxilo terminal (CT) de las proteínas de capa S y el dominio de unión a pared celular (CBD) de endolisinas derivadas de fagos de BAL. En este contexto, numerosas proteínas y péptidos de interés biotecnológico pueden ser diseñados como quimeras para su exposición en la superficie de bacterias ácido lácticas. Entre las posibles aplicaciones, la β -galactosidasa se presenta como una enzima de especial interés, dada su relevancia y amplio potencial en la industria.

Las β -galactosidasas son enzimas biotecnológicamente interesantes para la hidrólisis de lactosa y la síntesis de GOS. Las β -galactosidasas, β -D-galactósido-galacto-hidrolasas o lactasas) tiene un rol sumamente importante a nivel fisiológico como industrial. A nivel industrial se la utiliza para mejorar la digestión, solubilidad y sabor de la lactosa, debido a que catalizan la hidrólisis del enlace β -1,4-D-glicosídico de la lactosa, liberando glucosa y galactosa. Además de la hidrólisis, algunas β -galactosidasas pueden llevar a cabo reacciones de transglicosilación, en las cuales el residuo galactosil se transfiere a la lactosa u otro aceptor de carbohidratos, produciendo galactooligosacáridos (GOS), compuestos de importancia prebiótica debido al efecto estimulante en cepas beneficiosas para la salud, en la figura 13 se pueden observar las reacciones mencionadas (Hong et al., 2016).

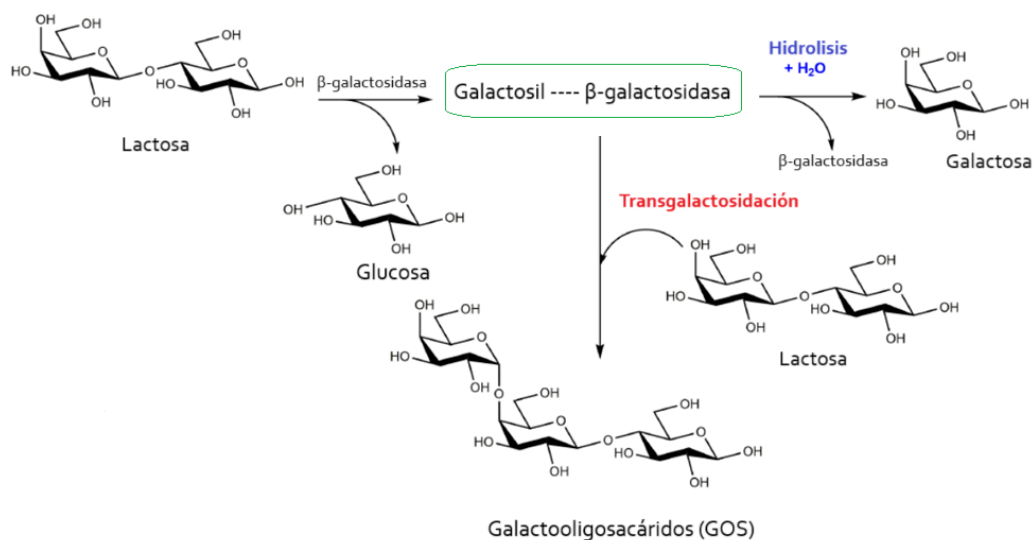


Figura 13. Representación esquemática de las reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima β -galactosidasa. Extraído de DeCastro et al., 2018.

La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa que se encuentra en la leche. En humanos, la intolerancia o malabsorción de lactosa es un problema común. De hecho, se estima que más del 70 % de la población adulta mundial tiene dificultades para digerir la lactosa, debido a una actividad ausente o reducida de la β -galactosidasa en el intestino delgado. La lactosa no digerida pasa al intestino grueso, donde es fermentada por la microflora colónica, causando síntomas como dolor abdominal, gases, náuseas y diarrea (Adam et al., 2004; Husain, 2010). La gravedad de estos síntomas varía y, de hecho, la mayoría de las personas toleran cantidades moderadas de lactosa en su dieta (Lifran et al., 2000). La estrategia convencional para aliviar los síntomas provocados por esta intolerancia comprende la ingesta de productos deslactosados o la ingesta de suplementos dietarios con β -galactosidasa exógena (Di Rienzo et al., 2013; Oliveira et al., 2011), sin embargo, la remoción de este azúcar en los productos lácteos conduce a cambios en sus cualidades organolépticas, disminuyendo la calidad de estos.

En la industria alimentaria y láctea, las fuentes comerciales de β -galactosidasa están dominadas por enzimas de levaduras y hongos (Saqib et al., 2017). Sin embargo el uso de *Lactobacillus acidophilus*, puede presentar ciertas ventajas como: Alta especificidad en transgalactosilación: genera principalmente enlaces β -(1 $\rightarrow$ 6), permitiendo la obtención de GOS

de estructura definida (Carević et al., 2018; Saqib et al., 2017), buena actividad en pH neutro-ácido y temperatura moderada (p.ej. 50–55 °C), útil en procesos de fermentación láctea y enzimáticos enzimático-probióticos (Nguyen et al., 2007) y facilidad de inmovilización en soportes poliméricos, logrando preparaciones más estables y parcialmente purificadas hasta 2 veces) durante el proceso de inmovilización (Carević et al., 2018; Nguyen et al., 2007).

La β -galactosidasa proveniente de *L. acidophilus*, forma parte de la familia GH42 (glicosil hidrolasas familia GH42), según su secuencia de aminoácidos y análisis de agrupamientos hidrofóbicos (Schwab et al., 2010). Según bases de datos genómicas, las β -galactosidasas GH42 (*LacA*) son comunes en cepas de *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, que también contienen la β -galactosidasa *LacLM*. Para mejorar la conversión catalítica de lactosa, se han caracterizado β -galactosidasas activas en condiciones extremas de frío, calor o en presencia de sal. Las bacterias ácido lácticas ofrecen la ventaja de ser una fuente de enzimas de calidad alimentaria con alta actividad en leche o suero de queso. La mayoría de las enzimas GH42 presentan tolerancia al frío, se caracterizan por una estabilidad térmica a largo plazo heterogénea y una temperatura óptima de actividad (T_{opt}) que varía entre 20 °C y 60 °C (Mangiagalli & Lotti, 2021). En la figura 14 se muestran distintas aplicaciones biotecnológicas que pueden tener las enzimas β -galactosidasas, ya sea por hidrolizar la lactosa o por reacción de transglicosilación.

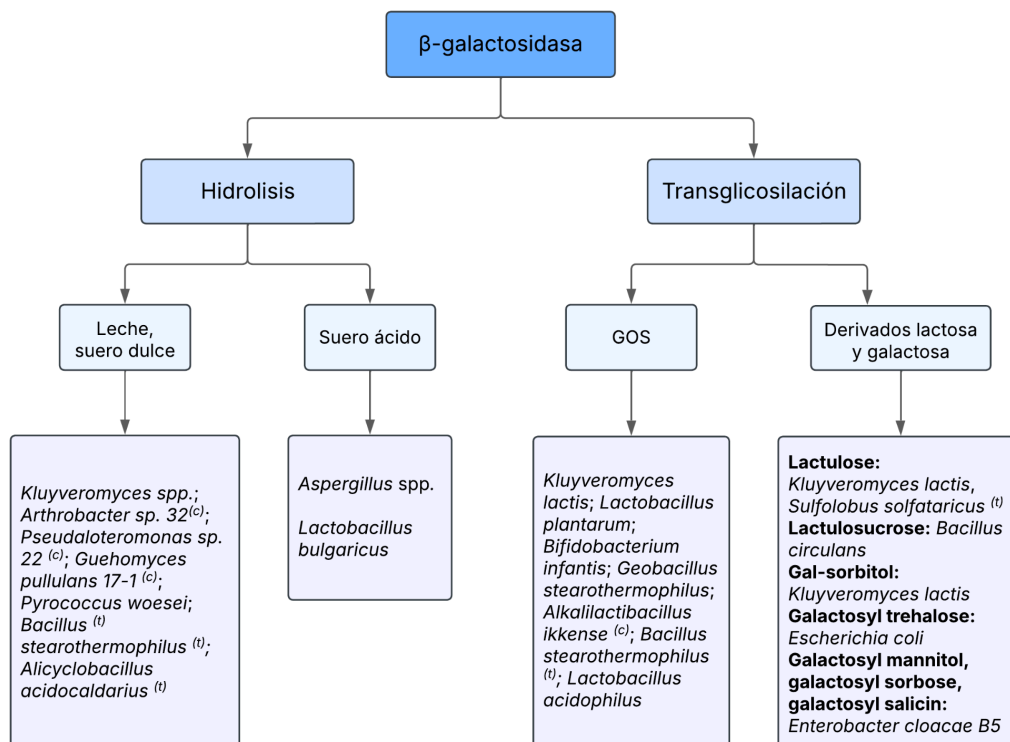


Figura 14. Aplicaciones biotecnológicas de β -galactosidasa. Hidrólisis de lactosa en leche y suero de queso y síntesis de GOS u otros derivados de lactosa/galactosa mediante reacciones de transgalactosilación. Los cuadros grises muestran ejemplos de especies microbianas de enzimas para cada aplicación. ^(c) Enzimas activas a bajas temperaturas; ^(t) Enzimas termofílicas. (Oliveira et al., 2011)

La enzima puede utilizarse tanto en forma soluble como inmovilizada, pero la enzima soluble sólo puede emplearse en procesos por lotes. La forma inmovilizada, en cambio, tiene la ventaja de poder usarse tanto en procesos por lotes como en operación continua. Se ha demostrado que este es un método conveniente para aumentar la termoestabilidad de la enzima y prevenir la pérdida de actividad (Panesar et al., 2010). Entre los efectos de la inmovilización se observó que la estabilidad térmica de la lactasa puede aumentarse (Kéry et al., 1991; Panesar et al., 2010; Chen et al., 2002). Las β -galactosidasas inmovilizadas pueden utilizarse de diversas maneras para hidrolizar la lactosa en la leche, el suero de leche/permeado de suero, y en la síntesis de oligosacáridos. La elección de la tecnología de proceso depende de la naturaleza del sustrato, las características de la enzima, la economía de producción y la comercialización del producto. Existen diversos mecanismos de inmovilización, como la adsorción física, el

atrapamiento, la unión covalente sobre distintos soportes y la exhibición en superficie celular (Chen et al., 2002; Husain, 2010).

El anclaje de proteínas a la pared celular bacteriana se logra principalmente por dos vías: de forma covalente, mediante la vía de la sortasa, o de forma no covalente, mediante un dominio proteico que interactúa fuertemente con componentes de la pared celular. En el anclaje mediado por sortasa, la proteína secretada lleva un anclaje C-terminal que contiene el llamado motivo LPXTG, seguido de un dominio hidrofóbico y una cola cargada positivamente (Pham et al., 2019; Schneewind & Missiakas, 2012). Uno de los sistemas de exhibición celular no covalentes explota los llamados dominios LysM, motivos de unión al peptidoglicano, que se sabe promueven la asociación con la pared celular de varias proteínas naturales (Visweswaran et al., 2014). Estos dominios se han utilizado para exhibir proteínas en BAL mediante la fusión del dominio LysM en el extremo N- o C-terminal de la proteína de interés (Turner et al., 2004; Visweswaran et al., 2014; Pham et al., 2019). Por ello, es de gran interés explorar el potencial de otros dominios de unión a pared, como el dominio CBD de la endolisina del fago PL-1 o el dominio CT de la proteína SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Como se ha mencionado a lo largo de esta introducción, las bacterias ácido lácticas representan vehículos prometedores para administrar moléculas activas a tejidos mucosos. Por ello, planteamos la exposición de la enzima β -galactosidasa de *Lactobacillus acidophilus* a la superficie de BAL mediante ambos dominios, con el fin de evaluar su capacidad de retención y su correcta exposición funcional, es decir, asegurando que la enzima mantenga su actividad tras el proceso de anclaje. De este modo, se busca establecer un sistema de exhibición de proteínas, sin recurrir a organismos genéticamente modificados, conservando el estatus seguro de las BAL y abriendo nuevas posibilidades en biotecnología.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Las características estructurales y funcionales que han puesto en evidencia los dominios SLAP del carboxilo terminal (CT) de la proteína S-layer (SlpA) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y los dominios CBD (*Cell wall Binding Domain*) de endolisinas de los bacteriófagos de *Lactocaseibacillus* como PL-1 permiten su uso como dominios de anclaje a pared celular para la exhibición en alta densidad de proteínas heterólogas sobre la superficie de Bacterias Ácido Lácticas, de importancia biotecnológica. Además, se planteó que el remodelamiento de la envoltura celular inducido por el pre-crecimiento de estas bacterias en presencia de NaCl —que incluye la expresión diferencial de SlpA y modificaciones en los polímeros secundarios de la pared— potencia la capacidad de anclaje de dichos dominios, mejorando la eficiencia global del sistema de exhibición proteica.

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es evaluar el potencial del dominio CT de SlpA y dominio CBD de la endolisina del fago PL-1 como plataformas de anclaje para la exhibición de proteínas funcionales en la superficie de bacterias ácido lácticas no modificadas genéticamente, preservando su estatus GRAS.

Objetivos específicos

1. Evaluación del dominio CT-SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Caracterización funcional como dominio de anclaje para la exhibición de proteínas heterólogas a la superficie de BAL no modificadas genéticamente. Comparación de métodos de remoción de capa S: evaluación de la eficacia de NaCl como alternativa biocompatible al uso de LiCl. Análisis de la estabilidad de unión del dominio CT-SlpA a la superficie bacteriana y determinación de viabilidad celular de *Lactobacillus* decorados bajo condiciones que simulan el tránsito gastrointestinal.
2. Caracterización del dominio CBD de la endolisina del bacteriófago PL-1 como plataforma de anclaje para la exhibición de proteínas en la superficie de bacterias ácido lácticas no modificadas genéticamente. Evaluación de su capacidad de unión en distintas cepas, su estabilidad bajo condiciones de estrés gastrointestinal in vitro y determinación de su blanco molecular de unión.
3. Optimización el sistema de exhibición de proteínas heterólogas mediado por CBDLys en *Lactobacillus paracasei* ATCC 27092, evaluando el efecto del crecimiento bajo estrés osmótico inducido por NaCl sobre las modificaciones estructurales de la envoltura celular y su impacto en la eficiencia de anclaje.
4. Evaluación de la aplicabilidad de los dominios de anclaje CT-SlpA y CBDLys, mediante el estudio de la adhesión a mucinas, la estabilidad durante el almacenamiento y la exposición funcional de la enzima β -galactosidasa de *Lactobacillus acidophilus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de microbiología

1. Cepas y medios de cultivo utilizados

Todas las cepas de BAL (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27092, *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27139, *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, *Latilactobacillus sakei* ATCC 15521, *Lacticaseibacillus casei* BL23, *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 12315, *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 y *Lentilactobacillus kefir* JCM 5818, *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258) fueron propagadas en MRS caldo (Biokar, Beauvais, France) a 37 °C, excepto *Streptococcus thermophilus* la cual fue propagada en caldo M17, bajo condiciones de crecimiento estáticas.

Escherichia coli HMS 174 (DE3) (Novagen EMD Biosciences, Madison, WI, USA) fue utilizada como cepa de expresión, y *E. coli* Top10 (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) fue utilizada como cepa de clonado. Las cepas de *Escherichia coli* fueron crecidas en condiciones aeróbicas en caldo Luria–Bertani (LB) a 37 °C. Se añadió el antibiótico Kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL cuando fue requerido.

El fago PL-1 fue propagado utilizando *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27092, cultivado en MRS caldo. El stock de bacteriófagos fue almacenado a 4°C en buffer fago.

2. Ensayo de unión de proteínas quimeras a cepas de Lactobacillaceae

El ensayo de unión difiere según se realice con microorganismos con presencia de capa S en su envoltura, o con ausencia de ella.

Para aquellas que presentan capa S, se siguió el protocolo descrito en Gordillo et. al., 2020. En la presente tesis, se utilizaron los siguientes microorganismos con presencia de capa S en su superficie: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 y *Lentilactobacillus kefir* JCM 5818. Las BAL fueron crecidas durante 16 hs, hasta alcanzar fase estacionaria, en las condiciones mencionadas. Luego se realizó una centrifugación a 14,000 rpm y se realizó un lavado con PBS. A continuación, con el fin de remover la capa S nativa o proteína S-layer, se incubó con LiCl 5 M a T° ambiente durante 45 minutos en rotación leve, pasado este tiempo se realizaron dos lavados

de 5 minutos con PBS 1x. Este paso es conocido como “decapado”, luego del cual, la densidad celular es ajustada a $DO_{600nm} = 1$. En un típico ensayo de unión, se incuban alícuotas de 300 μ l de cultivo de $DO_{600nm} = 1$ durante 1 h a 37 °C con 10 μ g de las proteínas de fusión quiméricas GFP-CTSlpA. La proteína purificada GFP y PBS se usaron como controles negativos y de autofluorescencia, respectivamente. Pasado el tiempo de interacción las células se colectaron mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS.

Por otra parte, para aquellas bacterias que no presentan capa S (*Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27092, *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27139, *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, *Latilactobacillus sakei* ATCC 15521, *Lactocaseibacillus casei* BL23, *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315, *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258), el ensayo de unión se realiza de forma directa, sin necesidad del paso previo de decapado (Figura 15).

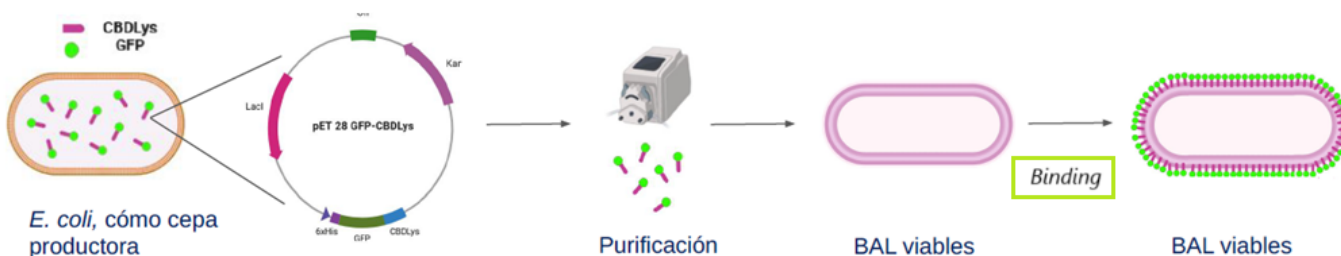


Figura 15. Esquema del sistema de exhibición de proteínas heterólogas en la superficie de BAL. Adaptado de Gordillo et. al. 2020

Para los ensayos de unión realizados en condiciones de estrés osmótico, las BAL fueron crecidas a 37 °C en condiciones estáticas utilizando MRS con NaCl. Se probaron diferentes concentraciones de alta salinidad utilizando NaCl como agente de estrés a 0,5 M, 0,75 M y 1 M. Luego el ensayo se realizó siguiendo el protocolo mencionado recientemente.

Finalmente, con el fin de corroborar la unión, las bacterias se resuspendieron en 100 μ l de PBS y se analizaron, por microscopía de fluorescencia (Axiostar Plus; Carl Zeiss) con un objetivo 100X y por citometría de flujo.

Para el análisis por citometría de flujo, los datos se adquirieron mediante el citómetro de flujo BD Accuri™ C6 Plus y posteriormente se analizaron con el software FlowJo 10.0.7 (<https://www.flowjo.com/>). Las células fluorescentes y no fluorescentes dentro de la población

fueron discriminadas en base a la intensidad de fluorescencia (GFP-H). Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se normalizaron respecto a las medias de tres repeticiones.

3. Estrategias de decapado con NaCl

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 fue cultivado en MRS a 37°C por 16 horas. Luego las células se cosecharon por centrifugación a 14,000 rpm por 10 minutos y se realizó un lavado con PBS. A continuación el pellet fue sometido a un tratamiento con NaCl 5 M por 45 minutos a T° ambiente, en rotación leve. Posteriormente se realizan lavados con PBS 1x y se continúan con los ensayos de unión.

Por otro lado, se probaron otras estrategias alternativas de decapado que implicaron el crecimiento *L. acidophilus* ATCC 4356 *over night* en MRS con 0,6 M de NaCl, y el precrecimiento en condiciones de alta salinidad seguido de un decapado con NaCl 5M. Una vez obtenido el pellet, éste es incubado en NaCl 5 M por 45 minutos a T° ambiente, en rotación leve. Finalizado ese tiempo, se realizan los correspondientes lavados y se continúa con el protocolo de unión.

4. Ensayos de tolerancia a estrés gastrointestinal

Los ensayos de simulación de estrés gastrointestinal, se realizaron siguiendo el protocolo descrito en Gordillo *et al.* 2020. Los microorganismos crecieron en las condiciones establecidas y se realizaron los ensayos de unión correspondiente, según presenten o no capa S. Finalizado el ensayo de unión las células se incubaron en MRS modificado con distintas condiciones que simulaban el ambiente gastrointestinal *in vitro*, por 2 horas, a 37°C. Las condiciones simuladas fueron las siguientes: pH ácido (pH 3, pH 4, pH 4,5 y pH 5), sales biliares (0,25 %, 0,5% y 1%), pancreatina (0,05 %, 0,1%, 0,25% y 3%), combinación de pancreatina, con sales biliares (0,3%:0,25%) y pepsina (0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%).

Se realizó el seguimiento de la fluorescencia de los lactobacilos marcados con las proteínas quimeras antes y después de los tratamientos, a su vez, se realizó el recuento de células viables en placa para el estudio de supervivencia. La supervivencia de los cultivos se evaluó determinando las UFC/mL en placas de MRS agar. Se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , seguidas de plaqueo en gota sobre placas de MRS. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Los recuentos obtenidos se compararon con los

recuentos iniciales, correspondientes a la condición control previa a la exposición de los microorganismos a las condiciones de estrés.

5. Efecto de tratamientos químicos sobre la unión con GFP-CBDLys

Células de *Lactocaseibacillus* fueron crecidas en condiciones de crecimiento estándar, hasta alcanzar fase estacionaria. Las mismas fueron recolectadas por centrifugación, resuspendidas en PBS 1X y llevadas a una $DO_{600nm} = 1$. A continuación se realizaron diferentes tratamientos químicos para desestabilizar o eliminar selectivamente, componentes pertenecientes a la pared celular. Los tratamientos llevados a cabo, fueron los siguientes:

- Incubación con TCA (ácido tricloroacético) al 0,05%, 0,1%, 0,5%, 2%, 5% y 10% a 100 °C y 37 °C, durante 10 minutos. El TCA permite eliminar polímeros secundarios de la pared celular (ácidos lipoteicoicos y CWPS).
- Incubación con SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10% a 100 °C durante 10 minutos. El SDS permite eliminar proteínas asociadas a la pared celular.
- Incubación con mutanolisina (100 U/ml) durante 2 horas a 37 °C. La mutanolisina permite desestabilizar el peptidoglicano.
- EDTA 10 mM. Quelante de cationes divalentes

Tras los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS 1X para eliminar cualquier resto de químicos. Finalmente, una vez completados los mismos, se realizaron los ensayos de unión siguiendo el protocolo previamente descrito.

6. Microscopía

6.1 Microscopía confocal

Las imágenes de superresolución por confocal y *Airyscan* se adquirieron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM980 (Carl Zeiss) del Centro de Microscopía Weber de la FCEN-UBA, equipado con un detector *Airyscan* 2 y un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63× (NA = 1,4). GFP-CBDLys se excitó con un láser de diodo de estado sólido de 488 nm. El análisis de imágenes se realizó utilizando el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27092 se cultivó en condiciones

control y en condiciones de alta salinidad. Las bacterias fueron crecidas en condiciones estáticas a 37°C durante la noche. Posteriormente, fueron cosechadas por centrifugación y lavadas con PBS 1X. La densidad óptica fue ajustada a una OD₆₀₀ de 1 y se realizaron ensayos de unión. Después del ensayo de unión, las bacterias fueron fijadas inicialmente con paraformaldehído (PFA). Los microorganismos se resuspendieron en una solución 1:1 de PBS durante 30 minutos. Luego, se realizó un lavado con PBS 1X y las células se resuspendieron en un volumen mínimo de PBS. Para el montaje de las muestras con Mowiol (alcohol polivinílico), se agregaron 3 µL de Mowiol y las células se cubrieron con un cubreobjetos. La muestra se almacenó a 4°C durante la noche antes de proceder a la obtención de imágenes.

6.2 Microscopía electrónica de transmisión

Se prepararon tres condiciones de *Lactobacillus acidophilus* para ser analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Un cultivo nativo, un cultivo tratado con LiCl 5M para remover su capa S y un cultivo con binding a GFP-CTSIpA en concentraciones sub-saturantes. Se realizó una primera fijación con una solución de Glutaraldehído 2,5% en Buffer fosfato 0,1M 4hs pH 7,4; a 4°C. Se realizaron dos lavados con buffer fosfato 0,1M de 15 minutos cada uno. Se realizó una segunda fijación, con tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer durante 60 minutos a 4°C. Luego de realizar dos lavados de 15 min. con agua bidestilada, se procedió a la deshidratación del material en alcoholes ascendentes (50°, 70°, 96°, 100°) con dos cambios de cada uno durante 15 min. Finalizando el proceso de deshidratación con dos cambios de acetona durante 10 min.

Se realizó la inclusión en resina epoxy "Durcupan" la cual se polimeriza a 60°C durante 72 hs. Una vez polimerizada la resina se realizaron cortes semifinos de 0,50 µm de espesor por medio de un Ultramicrotomo (Reichert Jung Ultracut E) con navaja de vidrio, los cortes se montaron en portaobjetos y se tiñeron con Azul de Toluidina para su observación al microscopio óptico.

Para observar las muestras al microscopio electrónico de transmisión se realizaron cortes ultrafinos 70-90 nm de espesor, finalmente los cortes se montaron en grillas de cobre, se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo (método de Reynold's). Se observaron al MET Zeiss 109, y se tomaron fotografías digitales con cámara Gatan W10000. Para la adquisición de las micrografías, se contrató el servicio de microscopía electrónica de la Facultad de Medicina-UBA Lanais-Mie. Las imágenes fueron analizadas con el programa *ImageJ*.

7. Producción stock viral

Lcb. paracasei ATCC 27092 a $DO_{600nm} = 1$, fue inoculado en 75 ml de MRS y se lo dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, se agregó la cantidad correspondiente a una $MOI = 0,05$; junto con 10mM $CaCl_2$ y se incubó a 37 °C. Se monitoreó a través del tiempo la densidad óptica a fin de cosechar los sobrenadantes cuando la DO_{600nm} bajara abruptamente indicando la lisis celular. El tiempo óptimo de cosecha de PL-1 fue de 8 horas. Se separó el sobrenadante de las células realizando primero dos centrifugaciones a 3200 x g durante 15 min a 4°C. Luego, los sobrenadantes fueron filtrados utilizando filtros de 0,45 μm (Millipore, EEUU) y concentrados por ultracentrifugación. La ultracentrifugación se realizó a 64000 x g durante 2 horas a 8°C. El pellet fue resuspendido en 500 μl de buffer de fago y guardado a 4°C para su posterior uso. El título obtenido se mantuvo entre $1-3 \times 10^{12}$ aproximadamente.

8. Cinética de adsorción de fagos

Lactiseibacillus paracasei fue cultivado hasta el inicio de fase exponencial. Luego las células fueron lavadas con PBS 1X y se ajustaron a $DO_{600nm} = 1$. Para analizar la cinética de adsorción 100 μL de células fueron infectadas con 100 μL de fago PL-1 con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,001. Se preparó un tubo por punto de tiempo, las células se eliminaron por centrifugación y se midieron los fagos no adsorbidos en el sobrenadante utilizando el método de doble agar (Dieterle et al., 2014). Se midió el porcentaje de adsorción a los tiempos 0, 2, 5, 15, 30 y 45 minutos, a 37 °C y en presencia de 10 mM $CaCl_2$. En los tiempos mencionados, se removieron las células por centrifugación a 14,000 rpm por 5 minutos. El fago no adsorbido, presente en el sobrenadante fue cuantificado, por recuento en placa de MRS agar. Para ello, se sembraron 3 mL de MRS Top agar, con 100 μL del sobrenadante, 10 mM de $CaCl_2$ y 100 μL de cultivo celular. Se dejó secar y se incubó en una estufa a 30 °C por 24 horas.

El tiempo cero, se tomó el total de fagos con la capacidad de interactuar con las células. El porcentaje de adsorción se obtuvo calculando las UFP/mL para cada uno de los tiempos ensayados (Ecuación 1). Luego se realizó la diferencia entre “el total” de los fagos en el ensayo (tiempo 0) con el fago no adsorbido (Ecuación 2). Con esa diferencia se obtienen las UFP/mL para el tiempo en cuestión. Una vez obtenido este valor, se calculó el porcentaje (Ecuación 3).

$$\text{Ecuación 1)} \quad \frac{UFP}{mL} = \frac{\text{número de playas contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen sembrado (mL)}}$$

$$\text{Ecuación 2)} \quad \frac{UFP}{mL} \text{ adsorbido} = \frac{UFP}{mL} \text{ tiempo 0} - \frac{UFP}{mL} \text{ no adsorbido}$$

$$\text{Ecuación 3)} \quad \% \text{ Adsorción} = \frac{UFP/mL \text{ adsorbidos}}{UFP/mL \text{ tiempo 0}} \times 100$$

Este ensayo fue aplicado en bacterias crecidas en su condición control y en MRS NaCl 0,75 M como también en células decoradas con GFP-CBDLys.

9. Extracción de componentes de pared

Las fracciones de los componentes de pared celular de *Lcb. paracasei* se extrajeron según el procedimiento descrito en Palomino et al. 2016. *Lcb. paracasei* ATTC 27092 fue cultivada en medio MRS y medio MRS conteniendo 0,75 M de NaCl. Las células fueron recolectadas durante la fase estacionaria. Las células se recolectaron por centrifugación a 3200 xg durante 15 minutos, se realizó un lavado. El pellet fue tratado calentándolo a 100 °C en 4 % (p/v) de SDS durante 90 min, una vez que se enfría, luego de una centrifugación a 1500 xg durante 5 minutos para descartar el debris celular, las paredes fueron recuperadas mediante una centrifugación a 20,000 xg por 20 min. Luego, las paredes celulares fueron lavadas cinco veces en agua y posteriormente incubadas con DNAsa (30 µg/ml) y RNAsa (5 µg/ml) durante 2 h a 37 °C, posteriormente, las enzimas son inactivadas a 65 °C. Se realizan dos lavados, y de esta manera, se obtiene la pared celular (CW), sin ácidos lipoteicoicos.

A la fracción de CW se le realizó un tratamiento con Ácido tricloroacético (TCA). Se resuspendió el pellet de CW en TCA 10% a 50°C por 2 horas. Al sobrenadante se le adicionan 2 volúmenes de etanol y se lo deja reposar a 4°C ON para que precipiten los polisacáridos presentes. Luego de una centrifugación a 18,000 g durante 20 minutos se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua. Esta fracción contiene los CWPS que se encontraban fuertemente asociados al PG.

El Peptidoglicano se obtuvo tratando las paredes celulares (CW) durante 2 horas a 4 °C con 10 % (p/v) de ácido tricloroacético para eliminar polímeros de ácido teicoico de la pared y luego lavándolas tres veces con agua. El PG fue dializado con agua a 4 °C y luego liofilizado.

La desacetilación del PG se llevó a cabo mediante tratamiento alcalino con 10 mM de NaOH durante 1 h a 37 °C (Palomino et al. 2013).

Los LTA se extrajeron según el protocolo propuesto por (Palomino et al., 2016). Parte del pellet celular cosechado fue resuspendido en un volumen de n-butanol. Se lo incubó durante 30 min a temperatura ambiente en agitación. A continuación se centrifugó a 18000 g por 20 min. El sobrenadante se liofilizó y resuspendió en agua bidestilada. Esta fracción contiene los Ácidos Lipoteicóicos.

En la figura 16 se muestra un esquema del procedimiento descrito anteriormente.

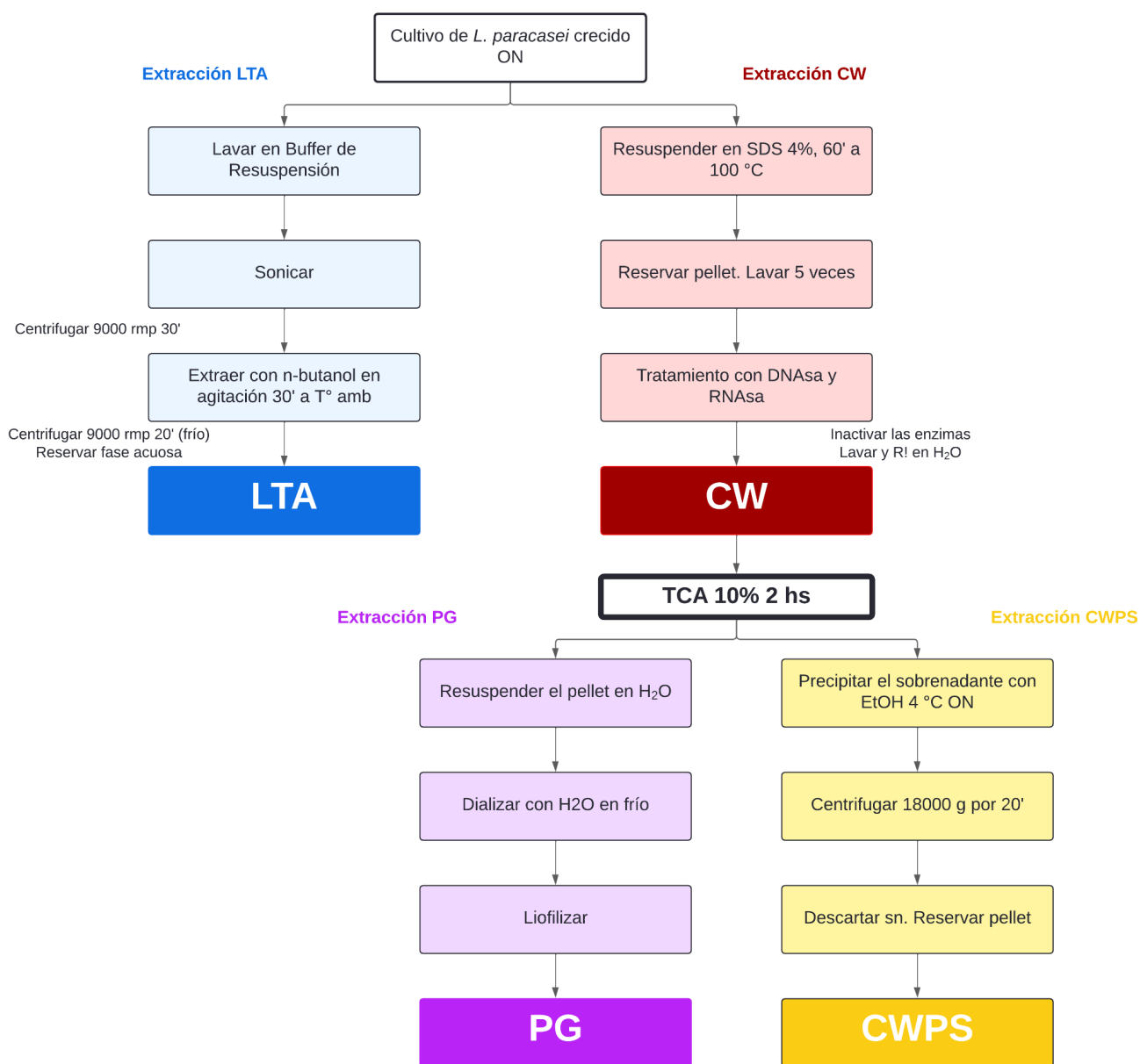


Figura 16. Esquema de extracción de componentes de pared de *Lcb. paracasei* 27092

10. Cuantificación de fósforo

La medición de fósforo de LTAs se realizó siguiendo el protocolo descrito en Chen *et al.* 1956. Para ello se llevó a cabo una curva de calibración, tomando como patrón al NaH_2PO_4 , el mismo es incubado en presencia del reactivo C, el cual contiene H_2SO_4 6N, H_2O , Molibdato NH_4 1,5 % y ácido ascórbico 10%. Las muestras se incuban durante 2 horas a 37 °C. Luego la absorbancia se mide a 820 nm.

11. Cuantificación de O-acetilaciones

Las paredes celulares de *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27092 se extrajeron a partir de cultivos en condiciones estándar en medio MRS y en MRS suplementado con 0,75 M de NaCl. El grado de O-acetilación se determinó mediante un ensayo colorimétrico basado en el método de Hestrin (Hestrin, 1949), con algunas modificaciones. Una masa de 4 mg de pared celular purificada se resuspendieron en 500 μL de agua destilada y se mezclaron con 500 μL de hidroxilamina clorhidrato 0,035 M en NaOH 0,75 M. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 25 °C. Luego se añadieron 500 μL de ácido perclórico 0,6 M y 500 μL de perclorato férrico 70 mM (preparado en ácido perclórico 0,5 M). El desarrollo de una coloración rosada, indicativa de la presencia de grupos O-acetilo, se cuantificó mediante espectrofotometría a 500 nm. Se utilizó acetato de etilo como estándar de referencia.

12. Cuantificación de Ramnosas

Las paredes celulares de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 se obtuvieron a partir de cultivos en MRS estándar y MRS suplementado con 0,75 M de NaCl. El contenido de ramnosa se determinó utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción con cisteína y ácido sulfúrico, según el método descrito por Raso *et al.*, 2021. Brevemente, 100 μg de pared celular purificada se resuspendieron en 500 μL de agua destilada, y se añadieron 1050 μL de ácido sulfúrico frío. Las muestras se agitaron por vortex y se incubaron a 100 °C durante 5 minutos en un termobloque, para luego enfriarse sobre hielo durante 10 minutos. Se transfirió 1 mL de cada muestra a cubetas descartables, y se midió la absorbancia a 396 nm y 427 nm como blanco. A continuación, se agregaron 32 μL de cisteína 1 M y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se realizaron nuevas lecturas de absorbancia a 396 nm y 427 nm. El valor de absorbancia corregido (ABS) se calculó mediante la fórmula:

$ABS = (ABS_{396} \text{post-cisteína} - ABS_{396} \text{pre-cisteína}) - (ABS_{427} \text{post-cisteína} - ABS_{427} \text{pre-cisteína})$.

Se construyó una curva de calibración mediante regresión lineal con estándares de ramnosa y se interpoló el contenido de ramnosa de cada muestra a partir de dicha curva.

13. Ensayos de DOT-BLOT de Peptidoglicano

Se realizaron ensayos de Dot-blot del PG extraído de cepas de *Lacticaseibacillus paracasei* crecido en condición control y en condiciones de alta salinidad. Los ensayos de dot-blot se realizaron como se describe previamente por Fina Martin et al., 2019; con algunas modificaciones. Tres tipos diferentes de peptidoglicano de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 se inmovilizaron en una membrana de PVDF (Thermo Scientific, Rockford IL, EE. UU.): PG extraído de condición control, PG extraído de condición de pre crecimiento en alta sal y PG de condición control desacetilado químicamente con tratamiento de NaOH. Cabe destacar que este PG es una fracción pura de mureína desprovisto de los polímeros de pared. En primer lugar se generaron curvas con cantidades crecientes de peptidoglicano inmovilizado de las tres condiciones descritas. Después de sembrar, las membranas de PVDF se lavaron una vez y luego se bloquearon durante la noche a 4 °C en PBS que contenía 3 % (p/v) de Tween 20 y 0,05 % v/v de BSA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, EE. UU.). Las membranas bloqueadas fueron lavadas e incubadas a 37 °C durante 1 h con 50 µg de proteína carrier GFP-CBDLys. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas tres veces con PBS Tween 20 0,05 % v/v y los puntos positivos fueron visualizados directamente por fluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas con el Imager 600 de Amersham (GE Healthcare Bio-Sciences) y fueron analizadas con el software *Image J* (<https://imagej.net/software/fiji/>). El archivo obtenido se convirtió a formato de ocho bits utilizando la opción "Imagen/Tipo". La Densidad Integrada Relativa (RID) fue medida según Rodríguez-Rodríguez et al., 2013.

14. Adhesión a mucinas

El ensayo de adhesión a mucinas se realizó siguiendo el protocolo de Bengoa et al., 2018, con algunas modificaciones.

En primer lugar se realizó la unión de las mucinas a placas de alta adhesión. Para ello se utilizó mucina tipo III de estómago porcino (Sigma-Aldrich) disuelta en PBS 1X estéril. Las soluciones de mucinas a una concentración de 10 mg/mL se inmovilizaron sobre placas estériles de

poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp Nunc, Roskilde, Dinamarca). Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 h, seguidas de una incubación a 4 °C durante toda la noche. Luego, se realizó una segunda incubación con la misma solución durante 2 h a 37 °C. Finalmente, los pocillos se lavaron dos veces con 200 µL de PBS. En segundo lugar, las cepas de *Lcb. paracasei* y *L. acidophilus* se cultivaron hasta alcanzar fase estacionaria a 37 °C en caldo MRS, se realizaron lavados y se ajustó a $DO_{600nm} = 1$. Se adicionaron 100 µL de la suspensión bacteriana a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C. Luego, se realizaron seis lavados con 200 µL de PBS estéril para eliminar las bacterias no adheridas. A continuación, se trataron los pocillos con 200 µL de una solución de Tritón X-100 al 5 mL/L durante 30 min a 37 °C para despegar las bacterias adheridas. Se retiraron 100 µL del contenido de cada pocillo, se diluyeron en PBS y se sembraron en placas con agar MRS. El recuento de de viables se realizó luego de 96 h de incubación a 37 °C. Los resultados se mostraron como log UFC/mL, respecto a la condición evaluada. Luego, el porcentaje de adhesión, se calculó según la ecuación 4. Se realizaron al menos tres réplicas independientes para estimar la adhesión de cada cepa.

Ecuación 4) $\%Adhesión = \frac{UFC/mL\ adherida}{UFC/mL\ control} \times 100$

15. Ensayos de conservación en frío y por liofilización

Lcb. paracasei ATCC 27092 fue cultivada en en MRS caldo y MRS NaCl 0,75 M a 37 °C hasta fase estacionaria. Posteriormente, las bacterias fueron cosechadas y se ajustaron a $DO_{600nm} = 1$. Se tomaron fracciones de ambos cultivos (MRS y MRS NaCl), las cuales fueron decoradas por medio del ensayo de unión, a la proteína quimera GFP-CBDLys, como se ha descripto previamente. Se reservó otra fracción sin decorar, como control.

Las células se prepararon según el método de conservación previsto (4 °C o liofilización). Para evaluar la refrigeración, se almacenaron bacterias decoradas y no decoradas a 4 °C, monitoreando su viabilidad y la estabilidad de la unión durante 28 días mediante seguimiento semanal.

La viabilidad de *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27092 en las distintas condiciones ensayadas se evaluó mediante recuento en gota sobre placas de MRS agar. Se realizaron al menos tres réplicas para cada punto evaluado. Cada ensayo se realizó por duplicado y el número de células viables se determinó a partir del recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) sobre placas de agar MRS.

La estabilidad de la unión fue cuantificada por citometría de flujo. Los datos de la población celular marcada fueron obtenidos con software BD FACSAria y el análisis de los mismos realizado con software FlowJo 10.0.7.

16. Ensayos de Inmunofluorescencia y Citometría de flujo con marcaje por inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia y de citometría de flujo con marcaje por inmunofluorescencia se adaptaron los protocolos descritos por Jose et al., 2005; McCarthy & Culloty, 2011, incorporando las siguientes modificaciones. Tanto *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 como *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27092 se cultivaron en caldo MRS a 37 °C hasta fase estacionaria. Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS 1X y se resuspendieron ajustando la densidad óptica a $DO_{600nm} = 1$. Se realizaron ensayos de unión según se describió previamente, luego de 1 hora, las bacterias se fijaron con PFA:PBS 1:1 por 30 minutos. Para realizar el ensayo de inmunoadhesión con las células adheridas, se trataron cubreobjetos durante 1 h con Concanavalina A. Seguido a este paso, el bloqueo se realizó incubando con PBS + BSA al 1 % durante 1 h; cabe destacar que para *L. acidophilus* se empleó un bloqueo al 1 % para la posterior observación por microscopía. La tinción primaria se llevó a cabo incubando las muestras con anticuerpo anti-His-tag mAb ratón (Genscript, cat. No. A00186) diluido 1/5000 en PBS/BSA a 4 °C toda la noche. Tras tres lavados en PBS 1X, se añadió el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 647 goat anti-mouse IgG (H+L) diluido 1/2500 y se incubó 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se realizaron otros tres lavados con PBS 1X y los cubreobjetos se montaron en Mowiol para su observación en microscopía de fluorescencia.

Para la citometría de flujo, el mismo protocolo de tinción se aplicó a suspensiones celulares. Tras el lavado final en PBS 1×, las células se resuspendieron en PBS/BSA a distintos porcentajes para evaluar el efecto del bloqueo: *L. acidophilus* se probó al 0,5 % y 1 % de BSA, y *Lcb. paracasei* ATCC 27092 al 0,5 %, 1 %, 3 % y 5 %. A continuación, se añadió el anticuerpo primario anti-His-tag (misma dilución que en IF), se incubó a 4 °C toda la noche y se lavó tres veces con PBS 1X. El anticuerpo secundario Alexa Fluor® 647 se incubó 1 h a temperatura ambiente, seguido de tres lavados adicionales y ajuste final del volumen a 50 µL en PBS 1X. La adquisición se realizó utilizando el software BD FACSAria (BD FACSDiva, versión de *firmware*

6.1.3) para la adquisición de datos, para el análisis posterior de los datos se utilizó el software FlowJo 10.0.7.

17. Actividad de galactosidasa

El ensayo para medir la actividad de β -galactosidasa se realizó según el protocolo descrito en (Miller, 1972). Se utiliza ONPG como sustrato, debido a que la enzima β -galactosidasa hidroliza al reactivo ONPG (incolore), liberando o-nitrofenol que en medio alcalino produce una coloración amarilla. Se midió la actividad de las fracciones solubles, tomando como control negativo, la fracción soluble sin inducir. La reacción se llevó a cabo a 37°C y se tomó como tiempo de reacción, el tiempo al cual apareció la coloración. Una vez registrado este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras a 420 nm. El cálculo de la actividad específica se realizó según la ecuación 7

$$\text{Ecuación 5)} \quad \mu\text{moles ONPG hidrolizado} = \frac{DO_{420} \cdot Vf (\mu L)}{\epsilon \cdot 1 \text{ cm}}$$

$$\text{Donde } \epsilon (\text{Coeficiente de extinción molar}) = \frac{4500 \mu L}{\mu\text{moles} \times \text{cm}}$$

$$\text{Ecuación 6)} \quad \text{Actividad} = \frac{\mu\text{moles ONPG hidrolizado}}{\text{tiempo de reacción (m)}}$$

$$\text{Ecuación 7)} \quad \text{Actividad específica} = \frac{\text{actividad}}{\text{mg de proteínas totales}}$$

18. Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc.). Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se normalizaron respecto a los valores promedio de las tres réplicas. Los resultados se presentan como medias $\pm$ desviaciones estándar (indicadas por las barras de error) de experimentos replicados. Para evaluar la significancia estadística, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba post hoc de Bonferroni; se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Para los ensayos de adsorción de fagos, se realizó un ANOVA de dos factores. Para los estudios de morfología e intensidad de fluorescencia mediante microscopía, se utilizó una prueba t. Se determinó la media de cada célula (control y pre-cultivadas en alta sal) con sus respectivos errores estándar

de la media. Se aplicó la prueba t de Student para muestras apareadas, y las diferencias se consideraron significativas con $p < 0.05$.

Ensayos de Biología Molecular

19. Clonación molecular, construcción de plásmidos y purificación de proteínas

Para la construcción de los vectores de expresión, se partió del plásmido pET28-GFP previamente disponible, que permite la expresión de proteínas de fusión N-terminal con GFP (Dieterle et al., 2014). A partir de este plásmido se diseñaron fusiones que añaden, al extremo C-terminal de GFP, los dominios de anclaje CTSIpA y CBDLys. Adicionalmente, en esta tesis se generó el vector pET28-βgal para la expresión de β-galactosidasa, sobre el cual también se diseñaron las proteínas de fusión correspondientes, incorporando los dominios CTSIpA y CBDLys en el extremo C-terminal de la β-galactosidasa

Se realizaron distintas construcciones a fin de obtener las proteínas de fusión que se detallan en la tabla 2

TABLA 2. Cebadores utilizados para las distintas construcciones realizadas

Construcción ¹	Cebador directo ² (5'→3')	Cebador Reverso ² (5'→3')	Fuente
GFP	TGACTCATATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGC Sitio de restricción para NdeI	TACCAGGATCCCTTGTACAGCTCGT CCATGCC Sitio de restricción para BamHI	Dieterle et al. 2014
GFP-CTSIpA	AGTGGATCCAACGTTAAAGCAAC Sitio de restricción para BamHI	TAGGAGCTCTAATCTAAAGTTTGC Sitio de restricción para SacI	Gordillo et al. 2020
GFP-CBDLys	AGTGGATCCGCTAATGGGACAACT Sitio de restricción para BamHI	TAGGAGCTCTTAAATGGATTGATC Sitio de restricción para SacI	Presente tesis
βgal	TAGTGCTAGCATGACACAATTATCAC G Sitio de restricción para NheI	ATAGGAATTCATTTCTCAATACTTG Sitio de restricción para EcoRI	Presente tesis
βgal-CTSIpA	ATAGGAATTCGCTAATGGCACAAC Sitio de restricción para EcoRI	ATAGCTCGAGTTAAATGGATTGAT C Sitio de restricción para XhoI	Presente tesis
βgal-CBDLys	ATAGGAATTCACGTTAAAGCAAC Sitio de restricción para EcoRI	ATAGCTCGAGTTATCTAAAGTTTGC Sitio de restricción para XhoI	Presente tesis

¹ Todas las construcciones se realizaron utilizando el plásmido pET28b

² La fracción subrayada corresponde a los sitios de restricción

Para la amplificación de la región CT de SlpA y de la β -galactosidasa se empleó la técnica de PCR utilizando como templado el ADN genómico de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Los primers fueron diseñados a partir de las secuencias correspondientes al gen *slpA* (GenBank: CAA61560.1) y al gen *lacZ* (GenBank: NC_021181.2). Por su parte, para el clonado del CBD de la endolisina del bacteriófago PL-1, los cebadores fueron diseñados en base a la secuencia del gen de endolisina (GenBank: AB035861.1), empleando como templado el ADN genómico purificado del fago PL-1.

Una vez construidos los plásmidos, los mismos fueron transformados en células de *E. coli* HMS 174 (DE3) por electroporación para la expresión y posterior purificación de las proteínas.

20. Extracción de ADN cromosómico de lactobacilos

Un volumen de 10 mL de células de *L. acidophilus* ATCC 4356 *Lcb. paracasei* ATCC 27092, en condición control y en condición de estrés osmótico (MRS NaCl 0,75 M), se cultivaron durante toda la noche, luego por centrifugación las mismas se cosecharon y se lavaron con 10 ml de EDTA 50 mM. El pellet se resuspendió en 600 μ L de Tris HCl 50 mM, EDTA 20 mM con 5 mg/ml de lisozima y 30 U de mutanolisina y se incubó 2 horas a 37°C. Luego se agregó RNAsa 0,1 mg/ml y proteinasa K 0,2 mg/ml. Las células se lisaron añadiendo SDS o Sarkosyl hasta una concentración final del 1% y se incubaron durante 16 horas a 42 °C. Se realizaron 2 extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y otras 2 extracciones con cloroformo/isoamílico (24:1).

Los ácidos nucleicos se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto o 0,6 volúmenes de isopropanol (dependiendo del volumen final alcanzado) a -20 °C al menos 1 hora. En algunos casos luego de colocado el etanol el ADN se recuperó empleando una varilla de vidrio, se dejó secar bien y la varilla se dejó toda la noche a 4 °C en agua o buffer TE (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). De esta manera se obtiene el ADN menos fragmentado y libre de sales.

Cuando se realizó la precipitación, el ADN se recuperó por centrifugación, se lavó con etanol frío al 50% se seco, se resuspendió en 50 ml de TE y se guardó a 4 °C.

21. Aislamiento de ADN del fago

La extracción del ADN del fago PL-1 realizó empleando un protocolo convencional con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). A 100 µl del stock de fago (1×10^{12} UFP/ml) se le agregaron 400 µl de buffer TE pH 8. Se agregó 0,1 µg/ml RNAsa (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) y se la dejó actuar por 15 minutos. Cuando el ADN se utilizó para la secuenciación, se incubó el fago por 30 min a 37°C con DNAsa (30 µg/ml) (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) y luego se inactivó. Se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló con el uso de un vortex y se centrifugó 5 minutos a 16000 x g. Se tomó la fase acuosa y se repitió este paso 2 veces más o hasta no observar una interfase. El fenol desnaturaliza las proteínas y el cloroformo favorece la separación de fases. Luego, se realizaron dos extracciones con un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), se mezclaron las fases y se centrifugó 5 min a 16000 x g.

A la fase acuosa obtenida, se le adicionaron 2,5 volúmenes de etanol 100% para disminuir la polaridad y favorecer la precipitación del ADN. Se agregó acetato de sodio 3M que neutraliza las cargas. Se dejó 30 minutos en hielo para favorecer la precipitación. Se centrifugó 30 minutos a 16000 x g, se lavó con EtOH 70% para eliminar el exceso de sales. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos. El pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en 80 µl de buffer TE pH 8 o agua miliQ. El ADN se guardó a 4°C.

22. Purificación de proteínas quiméricas

Las células de *E. coli* HMS 174 (DE3) transformadas se cultivaron en aeración a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5 en medio LB. La expresión de las proteínas se indujo añadiendo 0.1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Los cultivos de *E. coli* HMS 174, se expresaron según las condiciones señaladas en la tabla 3

TABLA 3. Condiciones de expresión óptimas para las proteínas quimeras

Proteína	Concentración IPTG	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo (h)
GFP	0,5 mM	25 °C	200	16
GFP-CTSlpA	0,1 mM	19 °C	100	16
β gal-CTSlpA β gal	0,1 mM	19 °C	60	16
GFP-CBDLys β gal-CBDLys	0,1 mM	23 °C	75	16

Una vez cosechados los cultivos, los pellets celulares se resuspendieron en un buffer de lisis (20 mM fosfato de sodio pH 7.4, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM fluoruro de fenilmetanosulfonilo, 2% v/v Tritón X-100) y se sonicaron (10 ciclos de 15 s). Los lisados clarificados se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min en frío, y los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.22 μ m para eliminar los restos celulares.

Para las proteínas GFP-CTSlpA y GFP-CBDLys, los lisados clarificados se cargaron en columnas HisTrap™ HP (GE Healthcare) equilibradas con un buffer de unión (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol), para su purificación por afinidad. La elución de la proteína se realizó mediante un gradiente creciente de imidazol usando un buffer de elución (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol). Las muestras eluidas se dializaron dos veces en un buffer de diálisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM ditiotretitol) y una vez más en el mismo buffer con 30% de glicerol, luego se almacenaron a -20 °C (Figuras MS2 Y MS3). La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford, utilizando el kit de determinación Quick Start Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE.

Para las construcciones con β -galactosidasa, se trabajó con los extractos proteicos. Las proteínas fueron caracterizadas por Western-Blot y SDS-PAGE.

23. SDS-PAGE

Con el objetivo de analizar la expresión de las proteínas recombinantes de interés y monitorear los distintos pasos de purificación, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) . Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando geles de separación al 10% o 12,5%, con un gel concentrador al 4,5%, empleando una cuba de electroforesis Mini-Protean® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 100 V.

Para el revelado de las proteínas, luego de la electroforesis , los geles se tiñeron en una solución de 0,1 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 en agua destilada: metanol: ácido acético (5: 5: 2) durante una hora. Para decolorarlo se hicieron 3 lavados en agua destilada a baño maría. Los geles fueron examinados y fotografiados utilizando el Transiluminador Benchtop 3UV.

24. Western-Blot

Se realizaron ensayos de Western Blot, con el fin de dar identidad a las proteínas clonadas y expresadas. En primer lugar, las proteínas se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE 10% y posteriormente fueron transferidas a una membrana de Polivinildifluoruro (PVDF), previamente activada con metanol, en buffer de transferencia (Buffer Tris-glicina, 20% metanol), empleando un transfer ECL-Semi-dry Blotter (Amersham Biosciences). La electrotransferencia se realizó a 45 mA durante una hora. Luego de transferir, se lavó la membrana durante 5 minutos con PBS. A continuación se bloqueó con 20 ml de buffer de bloqueo (3% m/v BSA en PBS tween 20 0,05% v/v) durante 16 h a 4°C. Luego se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con 20 ml de PBS tween 20 al 0,05% v/v, para eliminar el remanente del buffer de bloqueo, y se incubó con 10 ml del anticuerpo policlonal anti His-Tag (dilución 1:5000 en PBS) durante 90 minutos. Posteriormente se lavó la membrana 5 veces durante 5 minutos cada vez, con 20 ml de PBS tween 20 al 0,05% v/v y se incubó con 10 ml de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rabanito (Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/10000 en PBS) durante 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos cada vez con 20 ml de PBS tween 20 al 0,05% v/v. Una vez finalizado el protocolo las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Sigma), por medio

del equipo digitalizador de imágenes Amersham Imager 600. Este protocolo se utilizó para dar identidad a las proteínas quimeras: GFP-CBDLys, λ gal, λ gal-CBDLys y λ gal-CTSlpA.

25. Análisis de Expresión Génica

Se realizó un análisis de qPCR para evaluar la expresión de tres genes involucrados en la síntesis de la pared celular, identificados según la anotación del genoma de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 (GenBank: JAMOIQ000000000.1). Los genes analizados incluyeron *ltaS* (LTA sintasa, número de acceso GenBank MCM0750325.1), *wcaA* (glicosiltransferasa, número de acceso GenBank MCM0748901.1) y *oafA* (peptidoglicano O-acetilasa, número de acceso GenBank MCM0747659.1). La expresión génica se evaluó en condiciones de fase estacionaria tanto en control (MRS) como en condiciones de alta salinidad (0,75 M NaCl).

25.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN total de *Lcb. paracasei* 27092 en condición control y en condición de estrés osmótico se realizó según el protocolo de fenol caliente (Palomino et al., 2013). Se cosecharon 2 mL y el pellet bacteriano se resuspendió en 500 mL de Tris 50 mM EDTA 2 mM pH 8, Acetato de Amonio 0,2 M pH 4.

Se agregó 1 volumen de Fenol:Cloroformo ácido precalentado a 70 °C. Se mezcló bien empleando un “vortex” y se calentó a la misma temperatura durante 5 min. Luego se volvió a mezclar con “vortex” y se dejó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4 °C. Se tomó la fase acuosa y se precipitó el ARN con 1/10 de volumen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol, esto se mantuvo a -20 °C al menos 2 horas.

A continuación se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm a 4 °C, el pellet se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 ml de agua DEPC.

Para los ensayos posteriores de RT-PCR a una alícuota de ARN (aproximadamente 25 mg) se le agregaron 5 ml de DNAsa (1U/ml) (Promega) y se incubó 1 hora a 37 °C. La DNAsa se inactivó calentando durante 15 min a 65 °C. Se tomaron alícuotas de 10 μ L y se reservaron a -80°C.

La ausencia de ADN en las muestras se corroboró empleando la muestra de ARN como templado en una reacción de PCR. Todas las soluciones que se emplearon en el protocolo de extracción fueron libres de RNAsa.

25.2 Generación de cDNA y RT-qPCR

Con el fin de poder realizar estudios de expresión génica, se generaron cDNA de los genes de interés y luego se realizó una RT-qPCR.

A partir de 3 µg de ARN extraído de condición control y condición de estrés osmótico, se sintetizó ADN complementario (cDNA) utilizando la transcriptasa reversa MMLV (Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la reacción de síntesis de cDNA se incluyeron cebadores reversos específicos (25 pmol) para cada gen.

Condiciones de qPCR

La qPCR se realizó en un termociclador en tiempo real MyiQ (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.). El gen 16S rRNA se utilizó como referencia. Las secuencias de los cebadores fueron:

TABLA 4. Cebadores utilizados para el ensayo de RT-qPCR

Genes a evaluar	Cebador directo	Cebador reverso
<i>16S rRNA</i>	5'-GCGAAGGCGGCTGTCTGG-3'	5'-GGCACTGAAGGGCGGAAACC-3'
<i>wcaA</i>	5'-ATCGGTTCAATGCGACCAG-3'	5'-TTCAAGTCATCGAAGGT-3'
<i>ItaS</i>	5'-GGTCGAATGTCCATCCGG-3'	5'-ACGATGCTGATTATTGAT-3'
<i>oafA</i>	5'-ATGATGCAAGCCATCG-3'	5'-ATTGTGGATTGCCATTC-3'

La pureza y concentración del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, [EE.UU.](#)).

Análisis de Datos

La expresión relativa de los genes se calculó mediante el método $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2001), utilizando el software IQ™ 5 Optical System (Bio-Rad). Los niveles de expresión se normalizaron contra el gen constitutivo 16S rRNA, y los resultados se representaron como la expresión relativa en condiciones de control y alta salinidad. Los datos de qPCR se obtuvieron a partir de muestras por triplicado, y los resultados derivaron de dos experimentos independientes por condición. El análisis estadístico se realizó como se describió anteriormente.

Análisis Bioinformáticos

26. Predicción de la estructura secundaria de GFP-CBDLys

Se generaron modelos de la proteína GFP-CBDLys de longitud completa utilizando ColabFold v1.5.5 (AlphaFold2 con MMseqs2) (Mirdita et al., 2022), disponible en el entorno ColabFold en Google Colab. Los parámetros claves utilizados fueron: num_relax=5, template_mode=None, msa_mode=MMSeqs2 (Uniref + Environmental), pair_mode=unpaired + paired, model_type=auto, num_recycles=20, relax_max_iterations=200, pairing_strategy=greedy, max_msa=auto y num_seeds=1. El modelo mejor clasificado (rango 1) se seleccionó en función de los puntajes promedio de pLDDT (>80 indica alta confianza, >50 indica baja confianza) y valores bajos de PAE, lo que sugiere un posicionamiento preciso entre dominios o subunidades (Mariani et al., 2013; Surya et al., 2024; Tunyasuvunakool et al., 2021). La estructura secundaria del dominio CBDLys se predijo utilizando el servidor web PSIPRED (Liam J. McGuffin, Kevin Bryson, David T. Jones, 2000).

27. Estudio de docking molecular

Se generaron modelos tridimensionales (estructurales) de la proteína "GPF-CBDLys". Se modeló la secuencia completa de la proteína. Esto se realizó utilizando el ColabFold v.1.5.5 (AlphaFold2 utilizando MMseqs2)(Mirdita et al., 2022).

El mejor modelo fue seleccionado de acuerdo a la medida del pLDDT (Predicted Local Distance Difference Test). Este es un puntaje que indica que tan confiable es la predicción de la estructura de la proteína a nivel residuo por residuo (Los valores de pLDDT suelen representarse con un código de color en la estructura predicha donde el azul oscuro indica alta confianza y el rojo indica baja confianza, es decir estructuras desordenadas o predicciones poco confiables).

La predicción de la estructura secundaria del CBDLys se determinó utilizando PSI-blast (PSIPRED) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Liam J. McGuffin, Kevin Bryson, David T. Jones, 2000; Mirdita et al., 2022). Una vez obtenidos estos modelos, se realizó el estudio de docking molecular entre CBDLys y los ligandos con diferentes acetilaciones en el carbono C6 siguiendo el enfoque de blind docking debido a la falta de información sobre posibles hot-spots en CBDLys, donde se evaluó el número de poses por cluster. Es decir, no se buscó una interacción

específica con una región predeterminada de la proteína, sino que se exploraron todas las posibles áreas de la molécula simulando cómo los ligandos pueden unirse al CBDLys.

ANEXO

Medios de cultivo

MRS caldo

Peptona de caseína 19 g/L
Extracto de levadura 4 g/L
Extracto de carne 8 g/L
D (+) glucosa 20 g/L
Fosfato de potasio di-básico 2 g/L
Citrato de di-amonio 2 g/L
Tween 80 1 g/L
Acetato de sodio 5 g/L
Sulfato de magnesio 0,2 g/L
Sulfato de manganeso 0,04 g/L

MRS agar

Peptona de carne 10 g/L
Extracto de carne de buey 8 g/L
Extracto de levadura 5 g
Glucosa 20 g/L
Fosfato Dipotasio 2 g/L
Acetato de Sodio 5 g/L
Citrato triamonio 2 g/L
Sulfato de magnesio 0,20 g/L
Sulfato de manganeso 0,05 g/L
Agar agar 10 g/L
Tween 80 polisorbato 1 g/L

MRS TOP Agar

Peptona de carne 10 g/L
Extracto de carne de buey 8,00 g/L

Extracto de levadura 5,00 g
Glucosa 20 g/L
Fosfato Dipotasio 2 g/L
Acetato de Sodio 5 g/L
Citrato triamonio 2 g/L
Sulfato de magnesio 0,20 g/L
Sulfato de manganeso 0,05 g/L
Agar agar 6 g/L
Tween 80 polisorbato 1 g/L

LB caldo

Peptona de Caseína 10 g/L
Extracto de levadura 5 g/L
Cloruro de sodio 10 g/L

LB agar

Agar 15 g/L
Extracto de levadura 5 g/L
Cloruro de sodio 5 g/L
Tryptona: 10 g/L

M17

Peptona de caseína 5 g/L
Extracto de carne 5 g/L
Extracto de levadura 2,5 g/L
Lactosa (o glucosa, según la variante) 5 g/L
Disodio β -glicerofosfato 19 g/L
Ascorbato de sodio 0,5 g/L
Magnesio sulfato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g/L
Manganeso sulfato ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,005 g/L

Buffers**Buffer fago**

20 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

10 mM MgSO₄**Buffer de lisis**

20 mM buffer fosfato de sodio pH 7,4

500 mM NaCl

10 mM imidazol

1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF]

2 % v/v tritón X-100

Buffer de unión

50 mM Tris- HCl pH 7,4

300 mM NaCl

10 mM imidazol

Buffer de lavado

50 mM Tris- HCl pH 7,4

300 mM NaCl

500 mM imidazol

Buffer diálisis

50 mM Tris- HCl pH 8

0,1 mM EDTA

150 mM EDTA NaCl

PBS 1X

NaCl 0,8g

KCl 0,02 g

Na₂HPO₄ 0,144 gKH₂PO₄ 0,024 gH₂O c.s.,p 100 mL**Buffer de bloqueo**

PBS 10X10mL

Tween 20 (0,05%) 0,05 mL

Leche en polvo 5g

H₂O c.s.,p 100 mL**Buffer de Transferencia**

Tris base 0,303 g

Glicina 1,44 g

MeOH 20 mL

H₂O c.s.,p 100 mL**Buffer de lavado (Western-Blot)**

PBS 10X 10 mL

Tween 20 (0,05%) 50 µL

H₂O c.s.,p 100 mL**Buffer de Incubación**

PBS 10X 1mL

BSA 0,05 g

Tween 20 2 µL

H₂O c.s.,p 10 mL**Coomasei blue R-250**H₂O 50 mL

Metanol 50 mL

Ácido acético 20 mL

RESULTADOS

Capítulo 1

Evaluación del dominio CT-SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Caracterización funcional como dominio de anclado para la exhibición de proteínas heterólogas a la superficie de BAL no modificadas genéticamente.

La proteína SlpA es la proteína de capa S mayoritaria de *L. acidophilus*, consta de dos dominios estructurales bien definidos, los cuales presentan distinta funcionalidad: un dominio N-terminal de autoensamblado que es el dominio de interacción con el ambiente externo y un dominio C-terminal involucrado en el anclado de esta proteína a la envoltura celular. Nuestro grupo de investigación ha estudiado exhaustivamente la implicancia de este dominio en la interacción con la pared celular. Esta interacción está mediada por los aminoácidos básicos del dominio (principalmente Lisinas y Argininas) y las cargas negativas de los polímeros secundarios de pared, los LTA (Fina Martin et al., 2019). Dadas las características estructurales y funcionales del dominio CT de SlpA, se lo ha postulado como un atractivo candidato para ser utilizado como dominio de anclaje para poder vehiculizar péptidos funcionales como por ejemplo la exhibición de antígenos o compuestos de interés sobre la envoltura de BAL.

A su vez, estudios previos de nuestro grupo de investigación, han evidenciado que existe un aumento de la expresión de SlpA en *L. acidophilus* ATCC 4356 cuando las células son crecidas bajo estrés osmótico, utilizando NaCl como efector de estrés. Las variaciones en la pared celular y sus componentes podrían favorecer la separación de la capa S cuando las células se cultivan previamente en condiciones de alta salinidad (Palomino et al., 2016; Allievi et al., 2019). Por otro lado, dado que el LiCl, principal agente químico utilizado para la remoción de la capa S, puede inducir toxicidad cuando se administra por vía oral, resulta necesario explorar estrategias alternativas que prescindan de su uso. En este contexto, se propone emplear NaCl como agente de estrés osmótico y como método potencial para la remoción de la proteína S-layer.

Por otra parte, para diseñar sistemas de exhibición de proteínas basados en un sistema de administración oral utilizando bacterias probióticas, es esencial considerar las condiciones del tracto gastrointestinal, en particular la variación del pH y la presencia de compuestos como sales biliares y enzimas pancreáticas. Estos factores pueden afectar tanto la liberación del sistema (péptido funcional acoplado a dominio de anclaje) como la viabilidad de las bacterias vehiculizadoras.

En conjunto, este capítulo se centrará en la evaluación del dominio CT-SlpA como sistema de anclaje para la exhibición de proteínas heterólogas en BAL, en el análisis de la eficacia de NaCl como alternativa biocompatible al uso de LiCl como también en el estudio de la retención de la proteína en la envoltura bacteriana y la supervivencia celular bajo condiciones de estrés que emulan el ambiente gastrointestinal *in vitro*.

1.1 Exhibición de GFP en la superficie celular de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 mediada por CT-SlpA

Para estudiar la potencial capacidad de unión del dominio CT-SlpA como dominio para la exhibición de proteínas heterólogas a la superficie de las BAL, se diseñó la proteína quimera GFP-CTSlpA (Figura MS1). Cabe destacar que la fusión del dominio a la proteína reportera GFP tiene como objetivo simplificar el seguimiento de marcación de las BAL de manera directa por emisión de la fluorescencia, a través de microscopía de fluorescencia y cuantificación de la misma por citometría de flujo.

En primer lugar, la proteína quimera GFP-CTSlpA fue expresada heterológamente en *Escherichia coli*, purificada y utilizada en ensayos de unión. La unión del GFP-CTSlpA a la superficie bacteriana fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia, observándose una localización homogénea en toda la superficie de *L. acidophilus* ATCC 4356 desprovista de su capa S nativa. Por otro lado, al utilizar solo GFP no se observó fluorescencia en las bacterias, confirmando la especificidad del anclaje mediado por CT-SlpA (Figura 17A). Por otra parte, al llevar a cabo ensayos de unión sobre *L. acidophilus* que conservaban la capa S nativa, no se observó fluorescencia. Esto indica que para poder direccionar y permitir la interacción del dominio de anclaje a su molécula blanco, es necesario realizar una remoción de la capa S.

Luego, con el fin de determinar la capacidad máxima de unión, se incubaron cantidades crecientes de proteínas de fusión GFP-CTSlpA purificadas con un número definido de células de *L. acidophilus* sin capa S (DO_{600} de 1, aproximadamente 3×10^8 UFC/mL). El análisis por citometría de flujo mostró que la capacidad de unión máxima de la proteína de fusión fue de 10 μ g (Figura 17B-C). Considerando el peso molecular del dominio CTSlpA (17,5 kDa) y el número de UFC por ensayo de unión, se determinó que cada célula podía unir aproximadamente $1,14 \times 10^6$ moléculas de GFP-CTSlpA.

Estos resultados demostraron que la estrategia utilizada a partir de CT-SlpA como dominio de anclaje permite una exhibición eficiente y de alta densidad de proteínas heterólogas sin necesidad de modificarlas genéticamente.

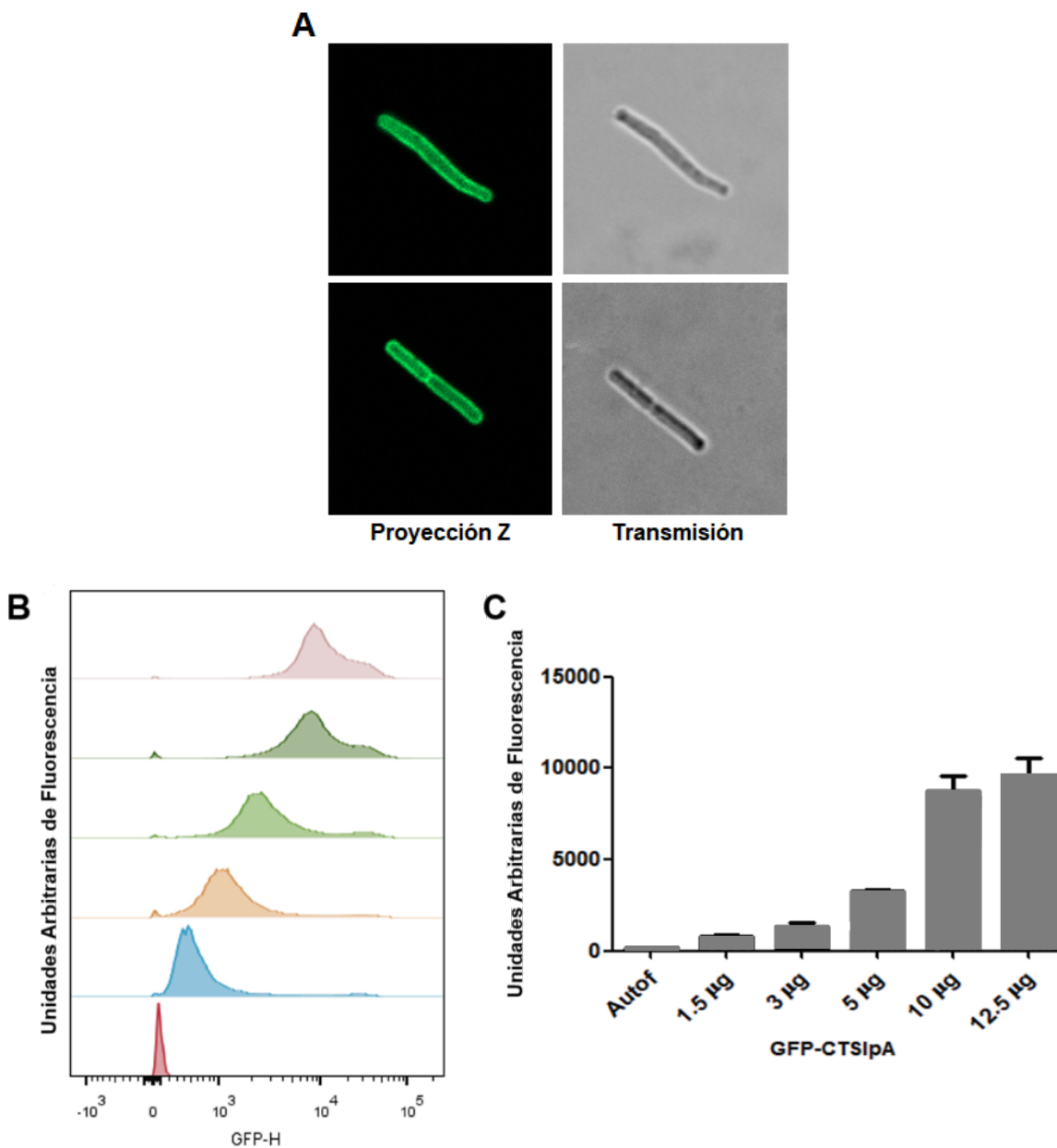


Figura 17. Unión de la proteína GFP-CTSlpA a la superficie de *Lactobacillus acidophilus*. **(A)** 300 µg de *L. acidophilus* a $DO_{600nm} = 1$, se sometió a un ensayo de unión con 10 µg de GFP-CTSlpA purificada. Las células se observaron mediante microscopía confocal de fluorescencia, excitación 488 nm (paneles izquierdo) y transmisión (paneles derechos). Ampliación $\times 1000$. La imagen muestra dos campos distintos del mismo preparado. **(B)** Histogramas

correspondientes a intensidad de fluorescencia para cada población celular marcada con cantidades crecientes de la proteína quimera. **(C)** Cuantificación de la capacidad de unión máxima mediante citometría de flujo. Se realizaron ensayos de unión a *L. acidophilus* con cantidades crecientes de la proteína GFP-CTSlpA. Las barras representan los promedios junto al desvío estándar de tres experimentos independientes.

1.2 Capacidad de unión de SlpA en la superficie de *Lactobacillus*

Para estudiar la capacidad de unión de CT-SlpA en la superficie de otras especies de lactobacilos, se realizaron ensayos de unión utilizando diferentes cepas de BAL con GFP-CTSlpA purificado y se cuantificó la unión mediante citometría de flujo. El ensayo se llevó a cabo utilizando cepas con capa S, como: *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Levilactobacillus brevis* ATCC 14869 y *Lentilactobacillus kefir* JCM 5818 y sin capa S como *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, *Lacticaseibacillus casei* BL 23 y *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27092. Se comparó el *binding* obtenido y los datos se relativizaron al 100% de la fluorescencia máxima proporcionada por *L. acidophilus*. En todos los casos, se encontró que la retención de la unión fue menor al 50% con respecto a *L. acidophilus* (Figura 18).

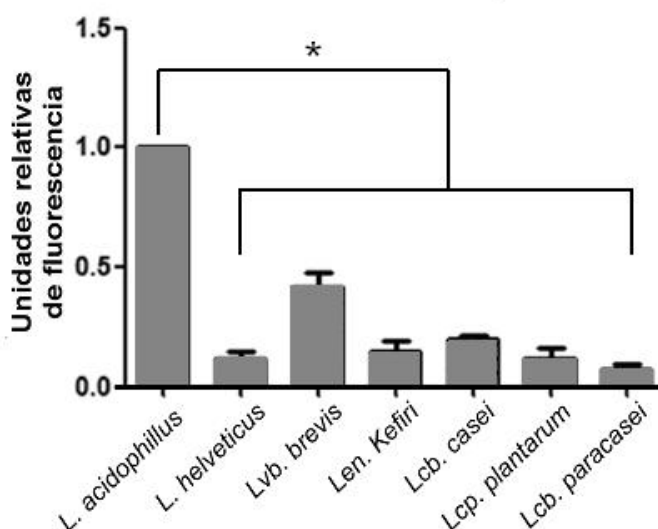


Figura 18. Capacidad de unión de SlpA en la superficie de cepas pertenecientes a distintos géneros de Lactobacillaceae. Unión de GFP-CTSlpA a diferentes especies de BAL mediante citometría de flujo. Las barras de error representan las desviaciones estándar de experimentos

realizados por triplicado. El asterisco (*) indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la intensidad de fluorescencia entre BAL y *L. acidophilus*.

En resumen, estos resultados mostraron que *L. acidophilus* fue el mejor vehículo para exhibir proteínas heterólogas en alta densidad de todas las BAL estudiadas. Si bien las cepas analizadas pertenecen a géneros filogenéticamente relacionados, podrían existir diferencias sustanciales en la composición de sus componentes de pared celular, particularmente los LTA, lo que posiblemente se refleje en variaciones en los mecanismos moleculares que median la interacción proteína-ligando.

1.3 Análisis de diferentes estrategias de decapado utilizando NaCl

Si bien el agente más comúnmente utilizado para remover la capa S en *Lactobacillus* es el LiCl, su uso puede comprometer la inocuidad del sistema, ya que residuos del compuesto podrían resultar tóxicos en aplicaciones orales. Considerando la necesidad de preservar el estatus GRAS de las bacterias empleadas, se exploraron estrategias alternativas de decapado basadas en NaCl como una opción más segura. A continuación, se presentan los resultados del análisis comparativo de diferentes condiciones de tratamiento con NaCl para la remoción eficiente de la capa S.

Cuando *L. acidophilus* ATCC 4356 fue tratado con 5 M de NaCl en lugar de 5 M de LiCl, se observó una retención de la unión de la proteína ancla del $45\% \pm 3,1\%$ en comparación con el control de fluorescencia máxima obtenida mediante la eliminación de la capa S con LiCl. Este resultado nos lleva a plantear, que el decapado con NaCl no estaría removiendo de forma completa la capa S nativa que rodea la envoltura bacteriana.

Teniendo en cuenta que estudios previos del grupo de investigación donde se hizo esta tesis, han demostrado un patrón diferencial en la expresión de la proteína SlpA en *L. acidophilus* ATCC 4356 bajo condiciones de estrés osmótico por NaCl generando un desprendimiento natural de la misma, se exploraron estrategias alternativas de decapado que involucran el crecimiento de la cepa en estas condiciones. En primer lugar, se evaluó el efecto del crecimiento en medio MRS suplementado con 0,6 M NaCl sobre la eficiencia de remoción de la capa S, condición que arrojó una retención de unión del $35\% \pm 3,8\%$ con respecto al control.

Finalmente, se combinaron ambos métodos: precrecimiento de los microorganismos en alta salinidad y posterior decapado con NaCl. Esta estrategia permitió una retención del $75\% \pm 7,8\%$

de la fluorescencia respecto al control con máxima fluorescencia, evidenciando una mejora en la eficiencia de anclado (Figura 19).

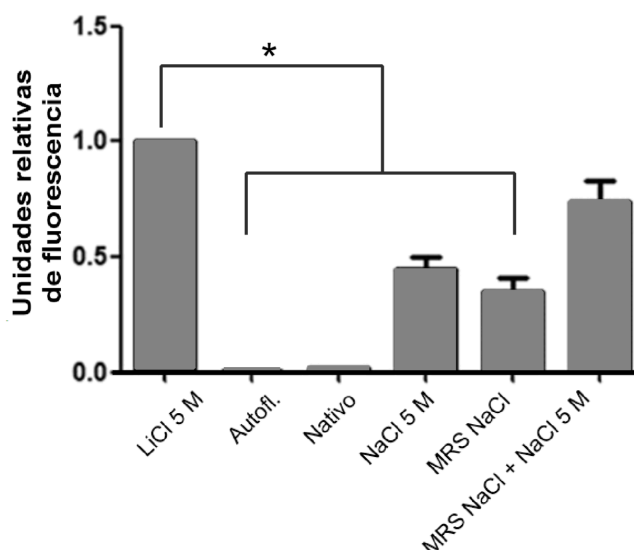


Figura 19. Análisis de diferentes estrategias de decapado utilizando NaCl. Los datos fueron relativizados al 100% de la fluorescencia máxima obtenida con el tratamiento de 5 M LiCl. Las barras de error representan las desviaciones estándar de experimentos realizados por triplicado. El asterisco (*) indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la intensidad de fluorescencia entre los tratamientos indicados y 5 M LiCl. Autof: autofluorescencia; nativo: células de *L. acidophilus* con su capa S nativa; 5 M NaCl: células de *L. acidophilus* tratadas con NaCl; MRS Na: células de *Lactobacillus* cultivadas en presencia de 0,6 M NaCl; MRS Na + 5 M NaCl: células sometidas a ambos tratamientos.

Por lo tanto, entre las estrategias que involucraron el uso de NaCl, la combinación del crecimiento de los microorganismos bajo condiciones de estrés osmótico seguido de un decapado con este mismo agente resultó ser la más efectiva. Es importante destacar que esta estrategia no presenta diferencias significativas respecto al control, el cual fue decapado con LiCl. Por lo tanto, el uso de NaCl representa una alternativa prometedora para el desarrollo de sistemas de exhibición más seguros, que mantengan el estatus GRAS de las bacterias utilizadas y contribuyan a preservar la seguridad del sistema evaluado.

1.4 Retención de la unión del dominio de anclaje y estudio de la viabilidad en condiciones gastrointestinales *in vitro*

Una posible aplicación de la utilización del dominio CT-SlpA como anclaje de proteínas funcionales con interés terapéutico en la superficie de BAL, es por ejemplo, la entrega de antígenos a la mucosa intestinal. Es por esto que resulta importante evaluar la estabilidad de la unión entre GFP-CTSlpA a la envoltura celular en condiciones que simulan el estrés durante el tránsito por el tracto gastro-intestinal (variaciones de pH, sales biliares o degradación por proteasas intestinales).

Al evaluar la retención de la unión en condiciones de estrés ácido (MRS con bajos valores de pH), la condición más adversa ensayada (pH 3) mostró una retención de aproximadamente 66% en comparación con la situación control. Por otro lado, la unión se vio ligeramente afectada por el aumento de la concentración de sales biliares, incluso cuando la concentración fue mayor que la fisiológica: 0,5% - 0,7% (Merck Sharp & Dohme Corp., s.f.). Además, cuando se incubó con pancreatina y pancreatina más sales biliares, la retención de la proteína fue $\geq 65\%$ (Figura 20A)

Otro aspecto importante a considerar, es la evaluación de la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* cuando son decorados con la proteína GFP-CTSlpA. Para estudiar la viabilidad celular cuando son expuestos a condiciones hostiles del tracto gastrointestinal, se compararon las tasas de supervivencia de tres tipos celulares diferentes: *Lactobacillus* en su condición control, es decir, con su capa S nativa, *Lactobacillus* sin capa S y *Lactobacillus* unido a GFP-CTSlpA. Los tratamientos a pH 3 y sales biliares 0,25 % mostraron valores de reducción logarítmica significativos ($p < 0,05$) de 2,13 y 2,06 UFC/mL, respectivamente, cuando las células carecían de su capa S nativa. En los otros casos, tanto las células con su capa S nativa, como las unidas a GFP-CTSlpA no mostraron una disminución significativa en sus tasas de supervivencia después de exponerlas a estas condiciones. Las células control de *Lactobacillus* exhibieron valores de reducción logarítmica de 0,73 y 0,93 en condiciones de pH 3 y sales biliares, respectivamente. Se observó una tendencia similar de reducción logarítmica en *Lactobacillus* decorado con GFP-CTSlpA (0,95 y 1,02 de reducción logarítmica). El tratamiento con pancreatina no tuvo un efecto estadísticamente significativo en ningún tipo de *Lactobacillus* (Figura 20B).

Estos resultados sugieren que *Lactobacillus* decorado con la proteína GFP-CTSlpA tendría un comportamiento comparable al de la cepa control en términos de viabilidad frente a agentes ambientales hostiles como el pH ácido y las sales biliares, en cambio, cuando la bacteria está decapada, resultó en una disminución significativa en la viabilidad, lo que indica que la decoración con el dominio de anclado podría estar brindando protección frente las condiciones de estrés ensayadas.

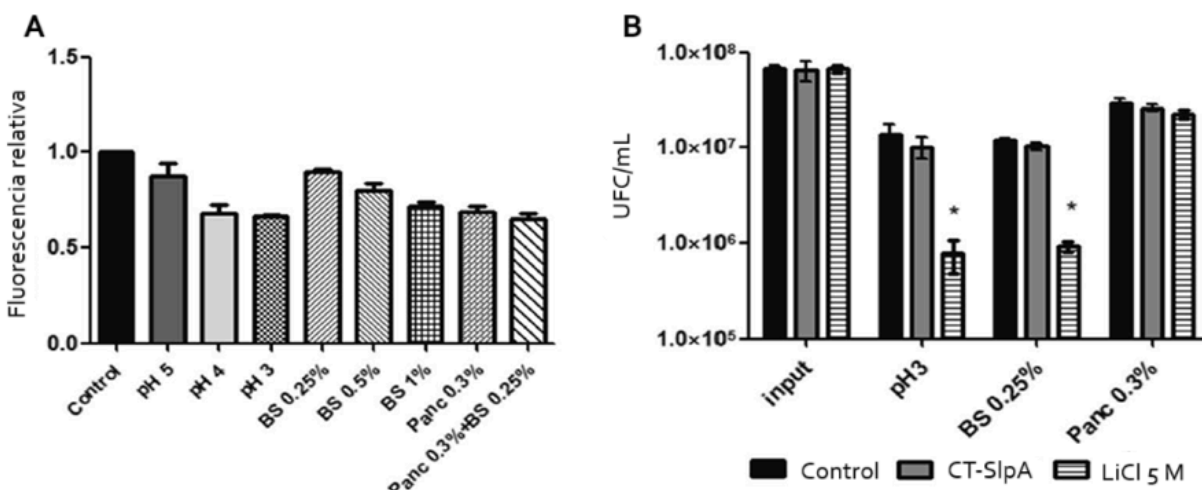


Figura 20. Estabilidad de la unión y tasas de supervivencia en condiciones de estrés gastrointestinal *in vitro*. **(A)** Unidades de fluorescencia relativa sobre la retención del *binding* en condiciones ácidas (pH 3–5), sales biliares (BS) y pancreatina, normalizados con respecto al control. **(B)** Tasas de supervivencia en condiciones gastrointestinales. Control: células de *L. acidophilus* con su capa S nativa. CT-SlpA: células unidas a la proteína quimérica. 5 M LiCl: *Lactobacillus* decapados con 5 M LiCl. Las barras de error representan las desviaciones estándar de experimentos realizados por triplicado. El asterisco (*) indica una diferencia significativa con respecto a la condición de entrada ($p < 0.05$).

1.5 La unión de GFP-CTSlpA a *Lactobacillus acidophilus* es localizada

Con el objetivo de evaluar una posible localización diferencial de la unión de GFP-CTSlpA sobre la superficie bacteriana, se realizó un ensayo de *binding* utilizando concentraciones sub-saturantes de GFP-CTSlpA. Las imágenes de microscopía confocal mostraron que GFP-CTSlpA fue capaz de unirse en toda la célula, aunque se observó una preferencia por los polos de los lactobacilos. (Figura 21A).

Para complementar estas observaciones y analizar con mayor resolución la organización de la superficie celular, se realizaron estudios mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en tres condiciones: células control de *Lactobacillus*, células sin capa S y células decoradas con GFP-CTSlpA.

El estudio de la superficie celular evidenció una estructura trilaminar típica de *L. acidophilus*. De adentro hacia afuera, la envoltura bacteriana está compuesta por la membrana celular, una capa interior más densa, correspondiente a la pared celular compuesta por peptidoglicano y la capa S más externa con una apariencia irregular y rugosa (Figura 21B1). Mientras que las células control presentaban estas tres capas, las células tratadas con LiCl presentaban solo dos, con una superficie más suave (Figura 21B2). Por otro lado, las células de *Lactobacillus* unidas a la proteína quimérica mostraron el mismo patrón observado en la microscopía confocal, donde los polos de las células presentaban una mayor densidad de proteínas (Figura 21 B3). Además, las mediciones del grosor de la envoltura celular de los polos de las células de *L. acidophilus* unidas a GFP-CTSlpA mostraron un aumento significativo ($83,56 \pm 9,86$ nm) en comparación con las células de control ($60,07 \pm 7,4$ nm), mientras que las células de *Lactobacillus* sin capa S mostraron una disminución significativa en el grosor de la envoltura celular ($39,59 \pm 5,73$ nm) (Figura 21 4C).

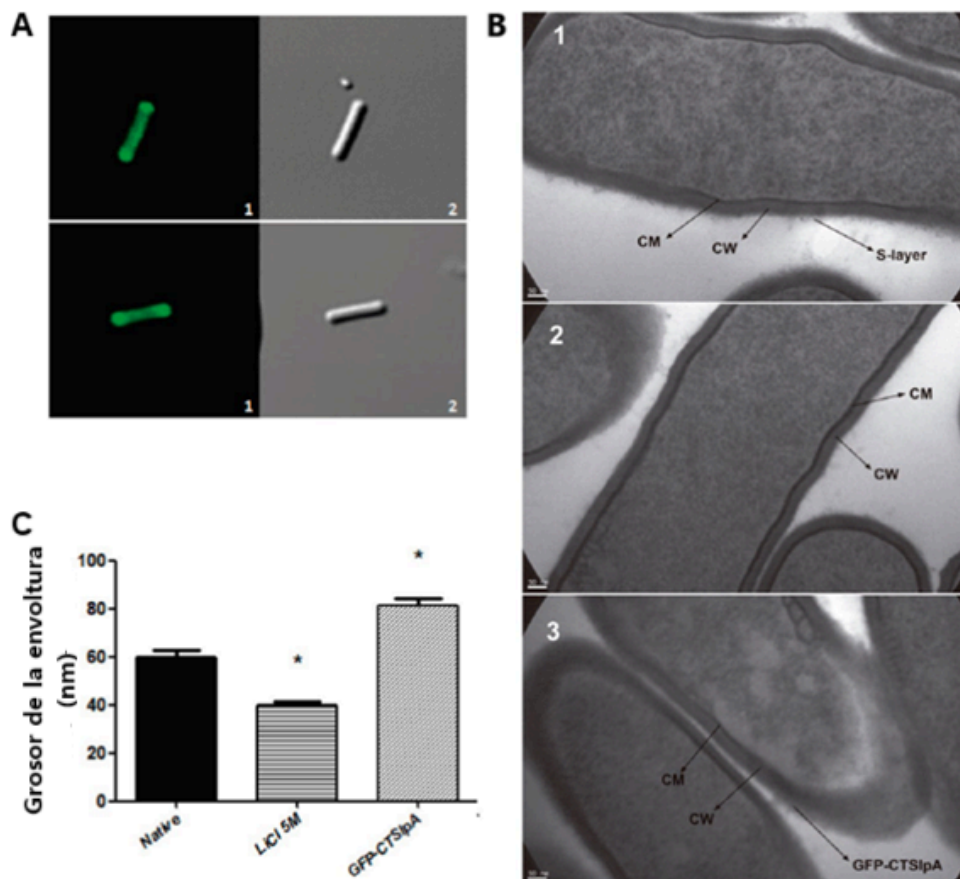


Figura 21. Unión localizada de GFP-CTSlpA a *L. acidophilus*. **(A)** Observación por microscopía confocal de *L. acidophilus* unido a GFP-CTSlpA en un ensayo de *binding* subsaturante. Imagen de fluorescencia correspondiente a GFP (1) Imagen correspondiente al mismo campo en el canal de luz transmitida (2). **(B)** Micrografías representativas de microscopía electrónica de transmisión de células nativas (1), células decapadas con 5 M LiCl (2) y células unidas a GFP-CTSlpA (3). CM: membrana celular, CW: pared celular. **(C)** Espesor de la envoltura celular en células nativas, células decapadas con 5 M LiCl y células unidas a GFP-CTSlpA. Los valores se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto a las células nativas.

1.6 Conclusiones capítulo 1

- El dominio CT de la proteína SlpA de *L. acidophilus* ATCC 4356 actúa eficazmente como dominio de anclaje, permitiendo la exhibición de proteínas heterólogas en alta densidad en la superficie celular sin necesidad de modificación genética.
- Entre las distintas especies de BAL analizadas, *L. acidophilus* mostró la mayor capacidad de retención del dominio CT-SlpA, siendo el vehículo más eficiente para la exhibición en comparación con otras cepas.
- Se identificó una estrategia alternativa de decapado utilizando NaCl, que, al combinar el crecimiento en alta salinidad seguido de tratamiento con 5 M de NaCl, logra una eficiencia de remoción significativamente mayor (retención del 75 % respecto al control con LiCl), ofreciendo una vía más segura para aplicaciones orales.
- Se obtuvo que en condiciones gastrointestinales la viabilidad celular no se ve afectada en células decoradas con la proteína GFP-CTSlpA. (Rol protectorio). Los tratamientos (pH 3 SB 0.25%) sí afectan la viabilidad cuando las células están decapadas.
- Se obtuvo una retención de unión de la proteína superior al 65% en condiciones de estrés que emulan el ambiente gastrointestinal, lo que indica que este sistema de anclaje posee un comportamiento robusto frente a desafíos fisiológicos.
- La unión del dominio CT-SlpA en condiciones subsaturantes no ocurre de manera uniforme, sino que presenta una localización preferencial en los polos del bacilo, lo que puede asociarse a la biogénesis de la envoltura bacteriana.

Capítulo 2

Evaluación del dominio CBD de la endolisina del bacteriófago PL-1. Caracterización como dominio de anclado para generar un sistema de entrega de proteínas en la superficie bacteriana.

En los últimos años, se ha demostrado que las endolisinas de bacteriófagos pueden ser utilizadas como proteínas de anclaje, con el fin de vehiculizar antígenos o proteínas funcionales sobre la envoltura bacteriana. Las endolisinas presentan un dominio N-terminal o dominio EAD (EAD, por sus siglas en inglés, *enzymatically active domain*) con actividad muramidasa capaz de catalizar la hidrólisis de peptidoglicano y un dominio C-terminal o dominio CBD (CBD, por sus siglas en inglés, *cell wall binding domain*) por el cual se realiza el reconocimiento y unión a la superficie bacteriana. Sin embargo, este dominio es específico entre fago y bacteria. Ese reconocimiento puede hacerse a través de estructuras conservadas de la envoltura celular, como el peptidoglicano (PG) o polímeros asociados, como los ácidos lipoteicoicos (LTA) y los polisacáridos de la pared celular (CWPS).

La endolisina del fago PL-1 ha sido ampliamente caracterizada por el grupo de Watanabe en cuanto a su función lítica y presenta una estructura modular típica, con actividad de N-acetilmuramilo-L-alanina amidasa (Watanabe et al., 1983, Kashige et al., 2000). Sin embargo, su dominio de unión a la pared celular (CBD) nunca ha sido evaluado como plataforma de anclaje para la exhibición de proteínas heterólogas.

En el presente capítulo se evaluará el dominio CBD de la endolisina del fago PL-1, analizando desde su capacidad de anclado a distintas bacterias ácido lácticas, así como también su tolerancia a condiciones de estrés gastrointestinal *in vitro*. Además, se investigará el blanco molecular de unión con el fin de optimizar la capacidad de exhibición sobre la superficie de BAL no modificadas genéticamente.

2.1 Clonado, Expresión y purificación de la proteína quimera GFP-CBDLys

El módulo de lisis del fago PL-1 exhibe una organización genética clásica que consiste en la codificación de una holina y una endolisina. La endolisina presenta una estructura bi modular con el dominio catalítico ubicado en el extremo N-terminal y el dominio de unión a la pared celular en el extremo C-terminal, característico de las endolisinas de fagos de bacterias gram

positivas (Figura 22A). Para evaluar la eficacia del CBD de la endolisina PL-1 (CBDLys) como dominio de anclaje, la región carboxiterminal se fusionó a GFP (27 kDa). Nuevamente, se utilizó la proteína GFP como herramienta reportera para el seguimiento de la unión de la proteína en las bacterias ensayadas. El CBD de la endolisina PL-1 (negrita) se clonó río abajo de GFP como se explica en la metodología y la proteína recombinante se produjo utilizando *Escherichia coli* como sistema de expresión y purificación heterólogo (Figura 22B). La proteína de fusión (46 kDa) se pudo eluir en una concentración de imidazol de 100 mM y el rendimiento obtenido fue de 14 µg/µL (Figura MS3). La caracterización de la proteína se realizó por Western-blot (Figura MS4).

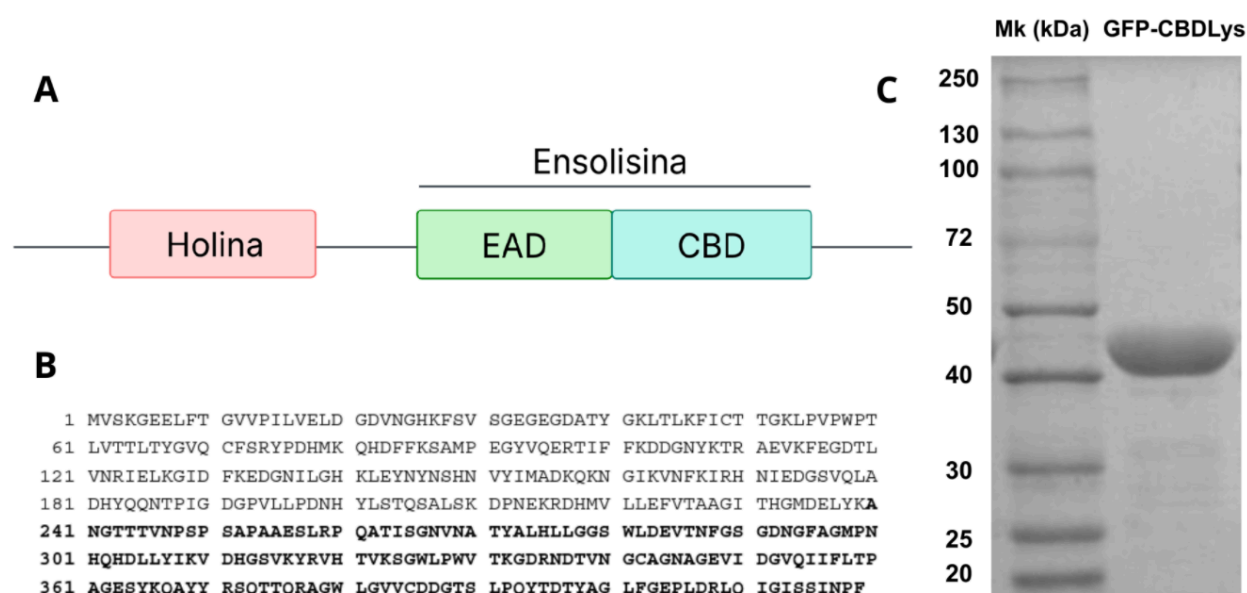


Figura 22. Construcción de la proteína GFP-CBDLys. **(A)** Representaciones esquemáticas del sistema Holin-Endolisina. Se muestran los dominios funcionales de la endolisina, EAD (dominio enzimáticamente activo) y CBD (dominio de unión a la pared celular). **(B)** Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica GFP-CBDLys, con la secuencia correspondiente a la proteína GFP, seguida de la secuencia del dominio CBD de la endolisina del fago PL1, resaltada en negrita. **(C)** SDS-PAGE que representa la proteína purificada GFP-CBDLys PM (46 KDa).

2.2 Capacidad de unión del dominio GFP-CBDLys a *Lcb. paracasei* ATCC 27092

Para probar la capacidad de anclaje del dominio CDBLys a la envoltura bacteriana, luego de expresar y purificar el GFP-CDBLys en el huésped heterólogo *Escherichia coli*, posteriormente, se

realizaron ensayos de unión clásicos en BAL. Inicialmente, para evaluar su potencial como dominio de anclaje, se analizó la unión de GFP-CBDLys a *Lacticaseibacillus paracasei* ATCC 27092, cepa hospedadora natural del fago PL-1, en la que se espera una alta especificidad de reconocimiento. Se buscó determinar la cantidad necesaria de proteína para poder producir una saturación en la fluorescencia obtenida. Mediante citometría de flujo se observó una curva de unión saturable, con una fluorescencia máxima detectada a partir de 10 µg de proteína de fusión (Figura 23).

La microscopía confocal confirmó además una fluorescencia periférica uniforme en la superficie bacteriana (Figura 23B). No se detectó señal en las células incubadas sólo con GFP, lo que respalda la especificidad del dominio CBDLys.

Para conocer la capacidad de unión del dominio ancla, se realizó una cuantificación considerando el número de moléculas de proteína de fusión unidas por UFC, considerando el peso molecular del dominio CBDLys (19 kDa) y el número de UFC utilizadas en el ensayo ($4,5 \times 10^7$ UFC), y se estimó que cada célula podría unir aproximadamente $7,04 \times 10^6$ moléculas de GFP-CBDLys.

Estos resultados indican una exhibición superficial eficiente y específica mediada por CBDLys en *Lcb. paracasei* ATCC 27092, destacando la capacidad del dominio de anclaje para exhibir una alta densidad de proteínas en la envoltura bacteriana.

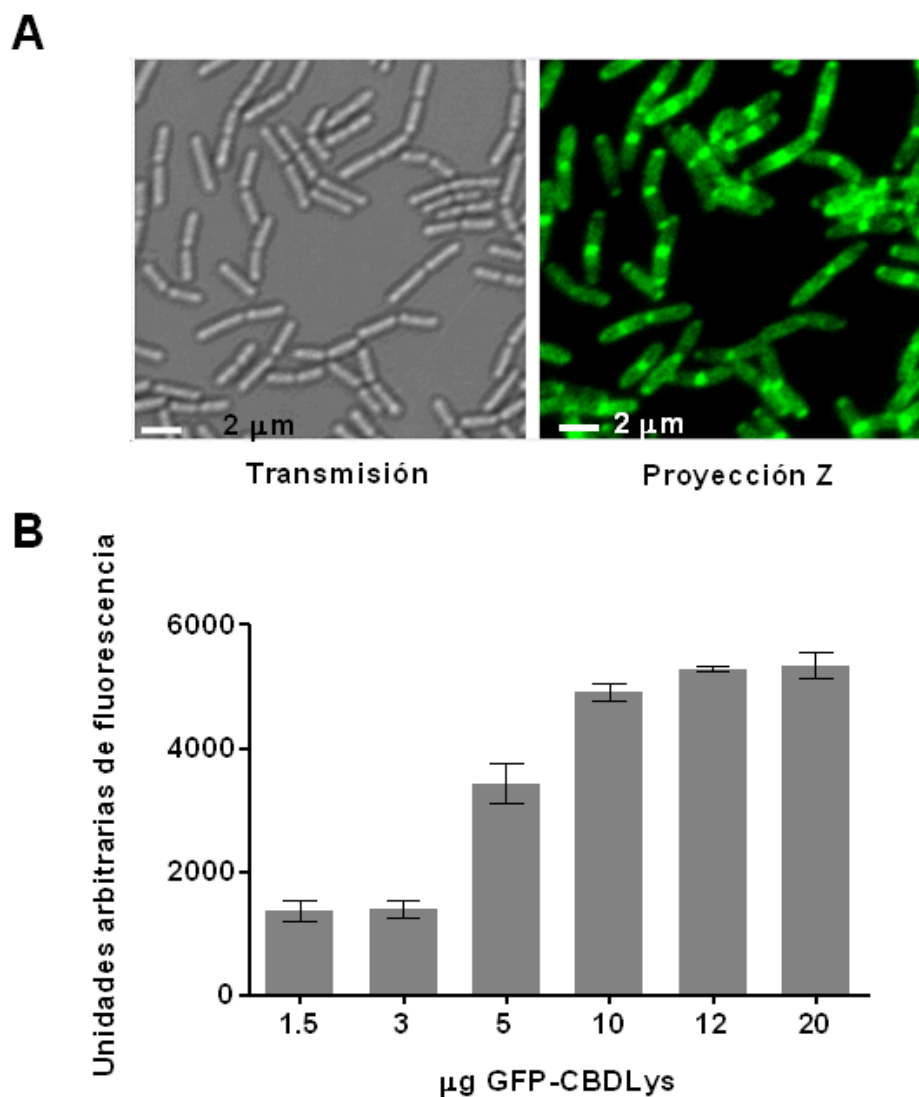


Figura 23. Ensayo de unión en *Lcb. paracasei* ATCC 27092. **(A)** Unión de GFP-CBDLys a la superficie de *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Imágenes representativas de transmisión (panel izquierdo) y proyección z de máxima intensidad (panel derecho) de las células. **(B)** Cuantificación de la capacidad máxima de unión mediante citometría de flujo. Se añadieron diferentes cantidades de GFP-CBDLys purificada a una cantidad igual de *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Curva estándar de las unidades de fluorescencia arbitrarias y la concentración proteica de GFP-CBDLys. Los barras representan los promedios y las desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

2.3 Detección de la capacidad de unión del CBDLys en la superficie de distintas BAL.

Para evaluar la especificidad de la unión de CBDLys a distintas especies de BAL, se analizó un panel de cepas de BAL que fueron seleccionadas por su diversidad filogenética, variabilidad estructural de la pared celular y su relevancia como probióticos o cultivos iniciadores. Las cepas seleccionadas representan un grupo estructural y biotecnológicamente diverso. Varias son probióticos consolidados o potenciales candidatos a probióticos, mientras que otras se utilizan ampliamente como cultivos iniciadores y en fermentaciones de alimentos.

Los CBD de las endolisinas de fagos suelen unirse con cierto grado de especificidad a componentes conservados de la pared celular de las bacterias gram positivas, como el peptidoglicano (PG), los ácidos lipoteicoicos (LTA) o los polisacáridos neutros (CWPS) (MJ Loessner 2005), cuya composición y accesibilidad puede variar entre las distintas especies de BAL. Esta diversidad fue tomada en cuenta para evaluar la aplicabilidad del dominio de anclaje de CBDLys en cepas de BAL con diferentes arquitecturas de superficie bacteriana.

Entre las cepas analizadas, las señales de fluorescencia más altas se observaron en ambas cepas de *Lcb. paracasei*, así como también en *Lcp. plantarum*, *Ltc. sakei* y *Lcb. casei* siendo *Lcb. paracasei* ATCC 27092 la cual exhibe mayor unión (Figura 24 A–B). Por el contrario, se detectó fluorescencia despreciable en *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lentilactobacillus kefir*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*, lo que sugiere que CBDLys se une preferentemente a miembros de los géneros *Lactocaseibacillus*, *Latilactobacillus* y *Lactiplantibacillus*. En base a estos resultados, y considerando que presentó la mayor capacidad de unión, *Lcb. paracasei* ATCC 27092 fue seleccionada como cepa modelo para los estudios posteriores.

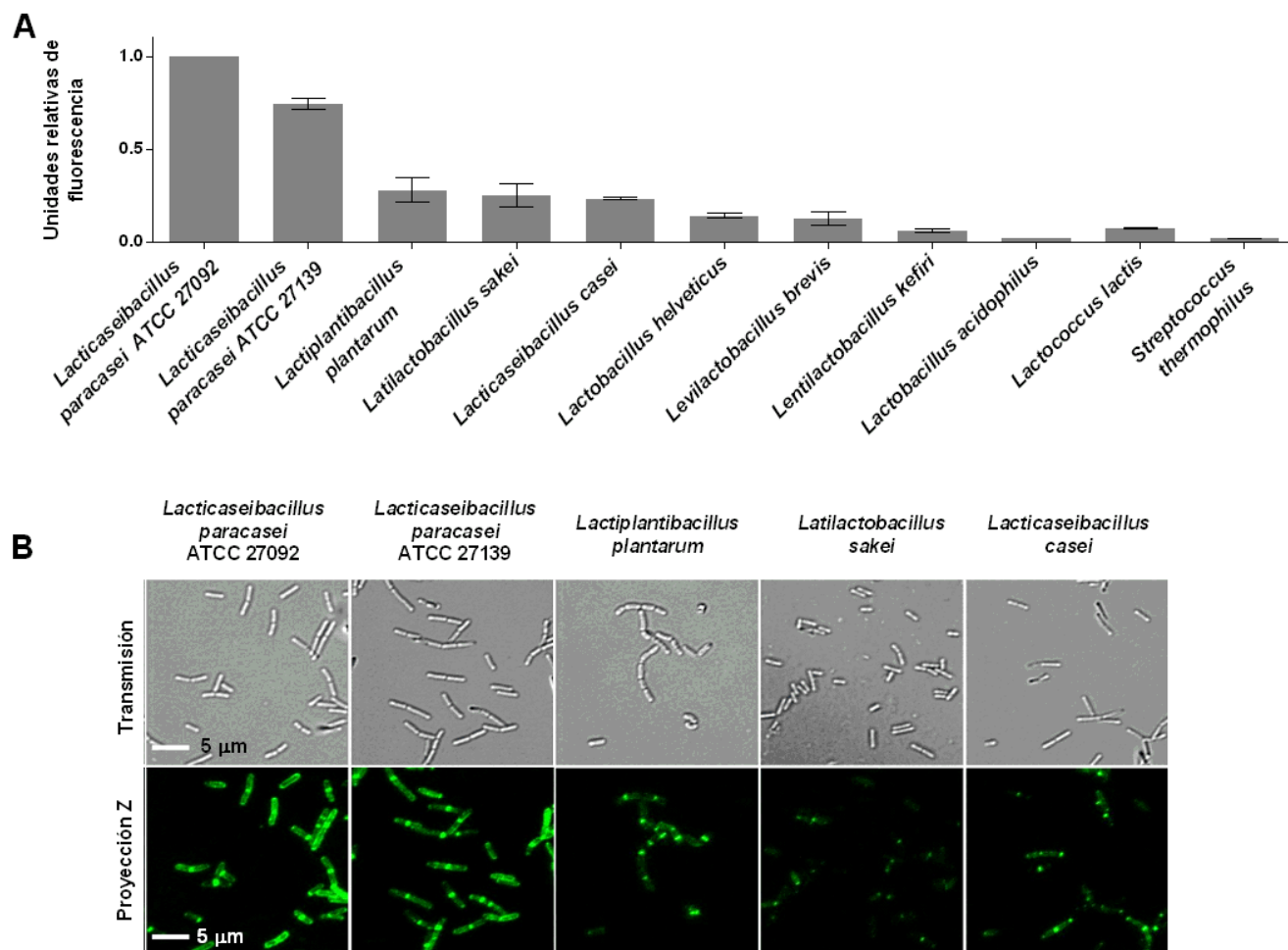


Figura 24. Ensayo de unión en bacterias ácido lácticas. **(A)** Capacidad de unión de GFP-CBD_{Lys} en la superficie de diferentes bacterias lácticas. Los barras representan la media $\pm$ Desvío estándar de tres experimentos independientes. **(B)** Imágenes representativas de transmisión (panel superior) y proyección z de máxima intensidad (panel inferior) de las cepas de BAL de las que se obtuvo unión de la proteína ancla. Las imágenes de fluorescencia se muestran con la misma configuración de visualización para permitir la comparación entre ellas. De mayor a menor unión, estas son: *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27092, *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27139, *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917, *Latilactobacillus sakei* ATCC 15521 y *Lactocaseibacillus casei* BL 23.

2.4 Retención de la unión del dominio de anclaje y estudio de la viabilidad en condiciones gastrointestinales *in vitro*

Se evaluó la capacidad de la proteína ancla, de permanecer en la superficie bacteriana cuando es sometida a condiciones que simulan el tracto gastrointestinal *in vitro*. Una vez que se llevaron a cabo los ensayos de unión las células se incubaron en solución salina por 1 hora, a 37°C, en distintas condiciones que simulaban el ambiente gastrointestinal *in vitro* teniendo en cuenta pH, concentración de SB, pancreatina y pepsina (Figura 25).

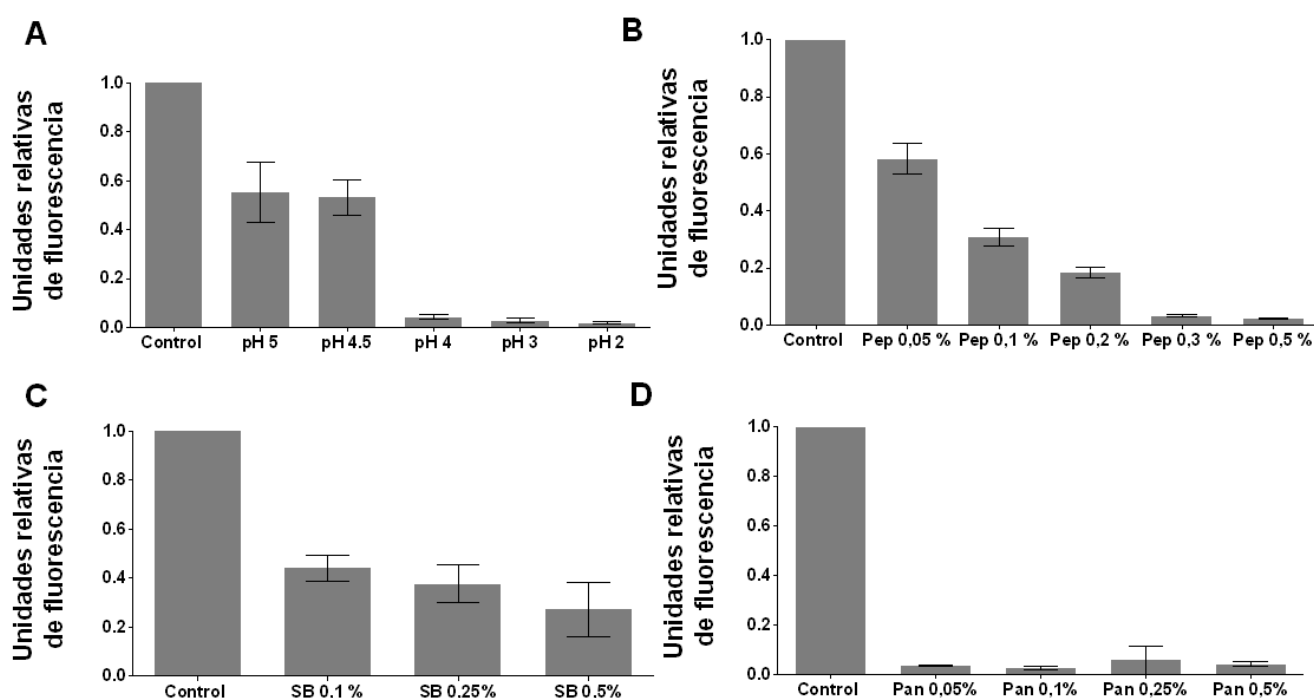


Figura 25. Evaluación de la unión de la proteína ancla, en condiciones de estrés gástrico *in vitro*.

(A) Unidades relativas de fluorescencia a pH ácido. (B) Unidades relativas de fluorescencia ante distintas concentraciones de pepsina. (C) Unidades relativas de fluorescencia en distintas condiciones de sales biliares. (D) Unidades relativas de fluorescencia ante distintas concentraciones de pancreatina. Los barras representan la media $\pm$ el desvío estándar de tres experimentos independientes.

Acerca de los estudios a distintos pH se observó una disminución en la tolerancia a la retención de la proteína ancla a medida que aumenta la acidez, perdiéndose por completo la retención de nuestra proteína a partir de la incubación a pH 4. Luego, se observó que cuando las células son incubadas con pepsina hay una retención del binding mayor al 50%, en la concentración mínima ensayada (0,05%). Luego, a partir del 0,3% hay una pérdida en la fluorescencia. En el caso de las sales biliares, se observó una tolerancia mayor. Se obtuvo una retención de la proteína ancla en las tres condiciones ensayadas. La retención fue del 44% con el 0,1% de SB, 38% para el 0,25% de SB y 27% para 0,5% de SB.

Respecto al uso de pancreatina, se pierde la retención de la unión aún en las concentraciones más bajas ensayadas. Debido a que la pancreatina es una mezcla entre lipasas, amilasas y proteasas (1:5,5:5), las proteasas pueden estar degradando el CBD de la lisina. Para evaluar que ocurre entre la proteína transportadora en presencia de distintas concentraciones de pancreatina, se realizó el ensayo de unión y la unión fue evaluada por citometría de flujo en distintos tiempos, desde 0 a 30 minutos (Figura 26A). Luego se evaluó la estabilidad de la proteína libre por SDS-PAGE (Figura 26B), se incubó la proteína ancla durante 30 minutos a 37°C en presencia de 3 condiciones distintas de pancreatina (0,05%, 0,1% y 0,25%).

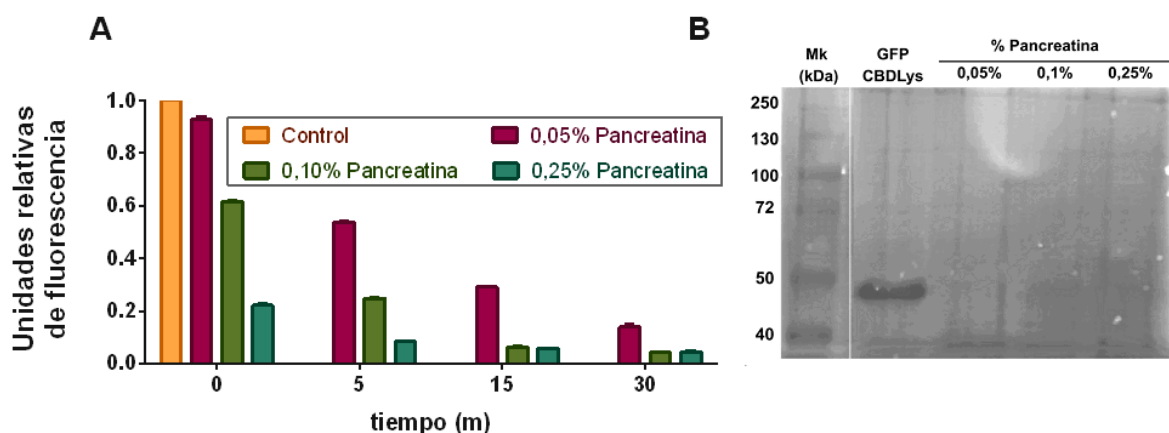


Figura 26. Evaluación de la estabilidad de la unión en presencia de pancreatina. (A) Unidades relativas de fluorescencia en función del tiempo (m). Se evaluó la estabilidad de la unión para 3 condiciones de pancreatina diferentes (B) SDS-PAGE de la interacción entre el CBDLys libre y distintas condiciones de pancreatina durante 30 minutos.

Se observó que independiente de la concentración utilizada, la estabilidad de la unión se ve afectada. Esto se refleja en la disminución de la fluorescencia en función del tiempo. A menor tiempo (0 y 5 minutos), con la concentración de pancreatina más baja, la degradación es mínima, sin embargo a mayores tiempos, aún en la menor concentración la proteína se degrada. Tras 30 minutos de incubación, ninguna de las condiciones evaluadas preserva la proteína íntegra: el análisis en SDS-PAGE (Figura 26B) confirma la degradación completa, concordando con los datos de citometría de flujo.

Es importante considerar estos resultados a la hora de generar un sistema de exhibición de péptidos sobre la superficie bacteriana a través del dominio CBD de la endolisina del fago PL-1, para ajustar las condiciones de modo tal que el sistema pueda prevalecer en las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal.

Posteriormente, con el fin de evaluar la viabilidad de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 en condiciones de estrés gastrointestinal, cuando es decorada con la proteína quimera, se realizó un recuento en placa de MRS agar, antes y después de exponer a la célula frente a condiciones de estrés, comparando dos tipos celulares, lactobacilos decorados con la proteína quimera y lactobacilos tal cual sin decorar. Las condiciones evaluadas, fueron aquellas donde se observó la retención de la unión de la proteína ancla a la envoltura.

Al igual que en el ensayo anterior, para simular un ambiente de estrés gastrointestinal *in vitro*, luego del ensayo de unión las células fueron sometidas durante 1 hora a condiciones de estrés por pH ácido, sales biliares, pepsina y pancreatina. Los resultados obtenidos fueron comparados con el control, el cual es equivalente a la medida de la viabilidad celular, sin ser sometida a condiciones de estrés (Figura 27).

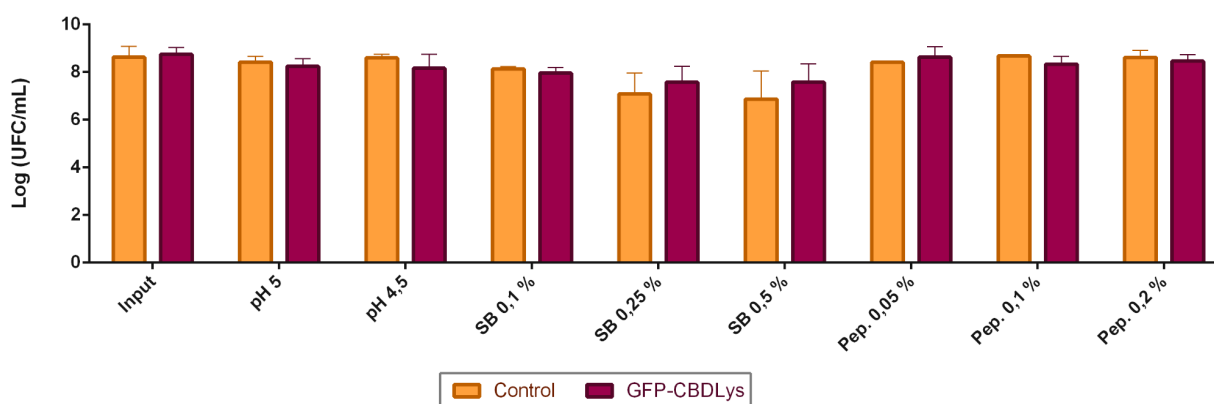


Figura 27. Supervivencia en condiciones de estrés gastrointestinal *in vitro*. Barras naranjas, viabilidad celular de *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Barras bordo, viabilidad celular de *Lcb. paracasei* 27092 cuando está decorado con la proteína GFP-CBDLys.

No se observaron diferencias significativas en la viabilidad, entre las diferentes condiciones de estrés ensayadas, lo que demuestra que el decorado con la proteína GFP-CBDLys no estaría afectando la viabilidad.

Por lo tanto, los resultados obtenidos, nos permiten decir que la proteína ancla presenta sensibilidad a las condiciones de estrés gastrointestinal, sin embargo, no afecta la viabilidad de la cepa utilizada como vehículo.

2.5 Identificación del blanco de unión del CBDLys

Las endolisinas suelen unirse a estructuras conservadas en la envoltura celular, como el PG o polímeros asociados, como los LTA y CWPS. Para determinar a qué componente específico se une el CBDLys, se trataron células *Lcb. paracasei* ATCC 27092 con agentes químicos que eliminan o degradan selectivamente los componentes de la pared celular.

CBDLys mostró una unión significativamente mayor en células pretratadas con ácido tricloroacético al 5%, un tratamiento que hidroliza los polímeros asociados al peptidoglicano, entre los que se encuentran los LTA y CWPS. Como se muestra en la Figura 28A, el tratamiento con 5% de TCA produjo un aumento de 4,8 veces en la capacidad de anclaje. Por el contrario, cuando las células fueron pretratadas con mutanolisina, una enzima que hidroliza PG mediante la ruptura del enlace glucosídico entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y la N-acetilglucosamina (NAG), se produjo una disminución significativa en la intensidad de la

fluorescencia en comparación con las células no tratadas. No se observaron cambios significativos de la unión en células tratadas con SDS al 10%, tratamiento que elimina las proteínas asociadas a la pared celular, ni con EDTA, un quelante de iones metálicos.

El tratamiento con TCA, el cual provoca la eliminación de CWPS y LTA, probablemente expone sitios de unión adicionales dentro de la capa de PG aumentando de este modo la capacidad de anclado. Por el contrario, cuando las células son tratadas con la enzima mutanolisina para desestabilizar la capa de PG, la unión del CBDLys se vio afectada significativamente. En conjunto, estos resultados sugieren que el principal blanco de unión de CBDLys es el PG.

Con el fin de investigar el efecto del TCA en la remodelación de la pared celular, *Lcb. paracasei* fue sometido a diferentes concentraciones de ácido tricloroacético a 100 °C y 37 °C, evaluando tanto la capacidad de unión de CBDLys como la viabilidad celular (Figura 28B–C).

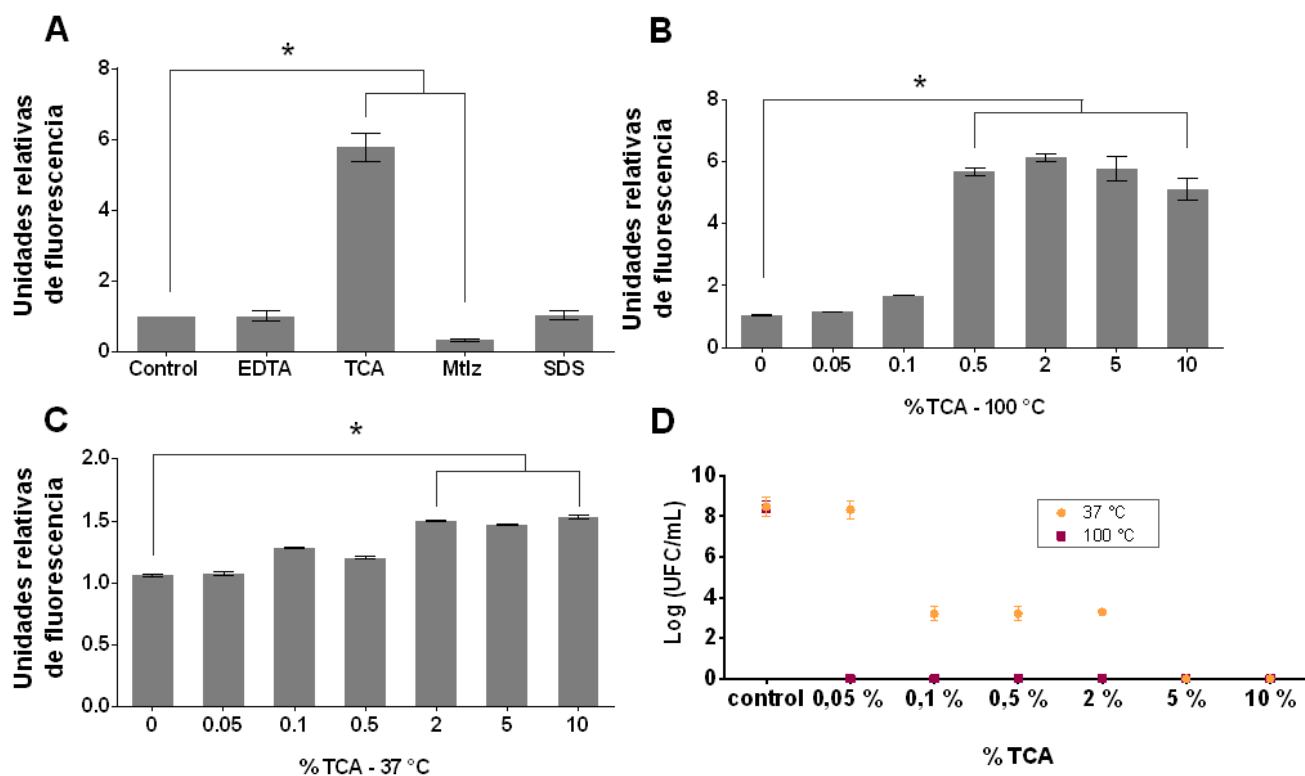


Figura 28. (A) Unidades relativas de fluorescencia de unión tras tratamientos químicos que modifican la envoltura bacteriana. Las medidas representan la media $\pm$ la desviación estándar. El asterisco (*) denota una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la intensidad de fluorescencia relativa a los tratamientos con TCA y Mutanolisina en comparación con el control. (B) Capacidad de unión de GFP-CBDLys a diferentes concentraciones de ácido tricloroacético a 100

°C. Se observan diferencias significativas en comparación con el control a partir del uso de TCA al 0,5 % **(C)** Capacidad de unión de GFP-CBDLys a diferentes concentraciones de ácido tricloroacético a 37 °C. Se observan diferencias significativas en comparación con el control a partir del uso de TCA al 2 %. **(D)** Recuento de viables de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 en log UFC/mL a distintos porcentajes de TCA, según la temperatura.

Si bien la mayor capacidad de unión se alcanzó utilizando un tratamiento con TCA al 0,5 % a 100 °C, este procedimiento resultó en la pérdida total de viabilidad celular respecto al recuento inicial ($8,47 \pm 0,46$ log UFC/mL). Cuando se aplicó TCA a 37 °C, se observó un aumento significativo de hasta 0,5 veces en la capacidad de unión en las concentraciones más elevadas analizadas. No obstante, este tratamiento también provocó una reducción marcada en la viabilidad celular, con recuentos de $3,2 \pm 0,34$ log UFC/mL (2 % de TCA), $3,1 \pm 0,34$ log UFC/mL (5 % de TCA) y $3,3 \pm 0,15$ log UFC/mL (10 % de TCA), en comparación con el valor inicial de $8,47 \pm 0,46$ log UFC/mL (Figura 28D).

Hay que destacar que este tratamiento no solo elimina los componentes de la pared celular, sino que también altera componentes intracelulares como el ADN y el ARN, lo que resulta en una célula decorada, pero no viable.

2.6 Conclusiones capítulo 2

- El dominio CBDLys mostró una unión superficial eficiente en *Lcb. paracasei* ATCC 27092, alcanzando una saturación de aproximadamente $7,04 \times 10^6$ moléculas por célula. A su vez, este dominio mostró la capacidad de unirse a la envoltura de otras BAL.
- En un panel de cepas de BAL, el dominio CBDLys presentó mayor afinidad por cepas de los géneros *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus* y *Lactiplantibacillus*.
- A partir de diferentes tratamientos químicos que desestabilizan o remueven de manera diferencial componentes de envoltura permitieron establecer que el blanco de unión primario del dominio ancla es el peptidoglicano.
- Se observó que el dominio en estudio presenta sensibilidad al mantenerse en la envoltura bacteriana bajo condiciones de pH inferior a 4 y en presencia de pancreatina. No obstante, al evaluar la viabilidad celular, no se observaron diferencias significativas entre la condición control y aquella decorada con la proteína ancla, independientemente del tipo de estrés evaluado.
- El tratamiento con TCA ocasiona un aumento significativo en el anclado de la proteína a *Lcb. paracasei* 27092, sin embargo, este tratamiento ocasiona pérdida en la viabilidad celular.

Capítulo 3

Optimización del sistema de exhibición de proteínas heterólogas mediado por CBDLys bajo condiciones de estrés osmótico: estudio de modificaciones de la envoltura celular.

Entre los métodos de unión no covalente, el pretratamiento con TCA u otros agentes químicos han sido considerados e investigados ampliamente para mejorar la capacidad de unión de distintos dominios de anclaje. Sin embargo, estos tratamientos conducen a la pérdida de viabilidad celular e implican protocolos potencialmente inseguros debido al uso de agentes químicos. Esto es particularmente relevante para aplicaciones donde la preservación del status GRAS es esencial, como el uso de plataformas de exhibición de grado alimentario. Para superar estas limitaciones resulta necesario explorar nuevos métodos que conduzcan a mejorar la capacidad de anclaje sin comprometer la viabilidad celular. Una estrategia innovadora y de carácter fisiológico es realizar el crecimiento bacteriano en condiciones de estrés osmótico por alta salinidad (NaCl).

En trabajos previos del grupo de investigación donde se realizó esta tesis, se ha observado que en *Lactocaseibacillus casei* BL23 el crecimiento en medios con alto contenido de sal conducen a modificaciones en la envoltura celular, incluyendo una reducción en el contenido de LTA como alteraciones estructurales en este polímero aniónico (Allievi et al., 2019; Palomino et al., 2013; Piuri et al., 2005). También se ha demostrado en el capítulo I de esta tesis, que el tratamiento con NaCl combinado con el crecimiento en NaCl, ofrece un método menos agresivo y no destructivo para remover la capa S nativa de *Lactobacillus acidophilus*, mejorando así significativamente la eficiencia de unión de la proteína de anclaje basada en SlpA (Gordillo et al., 2020). Dado que mejorar la capacidad de unión sin comprometer la viabilidad celular es un requisito clave para aplicaciones que involucran plataformas probióticas, en el presente capítulo se evaluará cómo afecta el estrés osmótico inducido por NaCl a la estructura de la envoltura celular de *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27092, así como su impacto en la eficiencia de anclaje de la proteína CBDLys en la superficie bacteriana.

3.1 Análisis de la capacidad de unión del dominio CBDLys mediante crecimiento bacteriano en estrés osmótico por NaCl

Para investigar si la remodelación de la envoltura celular inducida por un alto contenido de sal tiene un impacto positivo en la capacidad de anclaje del CBDLys, se cultivó *Lcb. paracasei* ATCC 27092 en medio MRS suplementado con distintas concentraciones de NaCl. El análisis de la citometría de flujo reveló un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia en las concentraciones de 0,75M y 1 M de NaCl. En particular, la condición con MRS + 0,75 M NaCl presentó un incremento de 2,8 veces en la intensidad de fluorescencia respecto al control, lo que indica una mejora sustancial en la capacidad de unión (Figura 29A). A diferencia del tratamiento con TCA, que compromete notablemente la viabilidad celular (Figura 28D, capítulo 2), el crecimiento en condiciones de alta sal mantuvo los recuentos de viables en $8,17 \pm 0,30$ log UFC/mL, comparables al control ($8,19 \pm 0,20$ log UFC/mL). El pre-crecimiento en condiciones de alta salinidad también resultó en una mayor capacidad de unión para las otras especies analizadas (Figura 29B), lo que respalda el potencial de aplicar esta estrategia en un espectro más amplio de cepas.

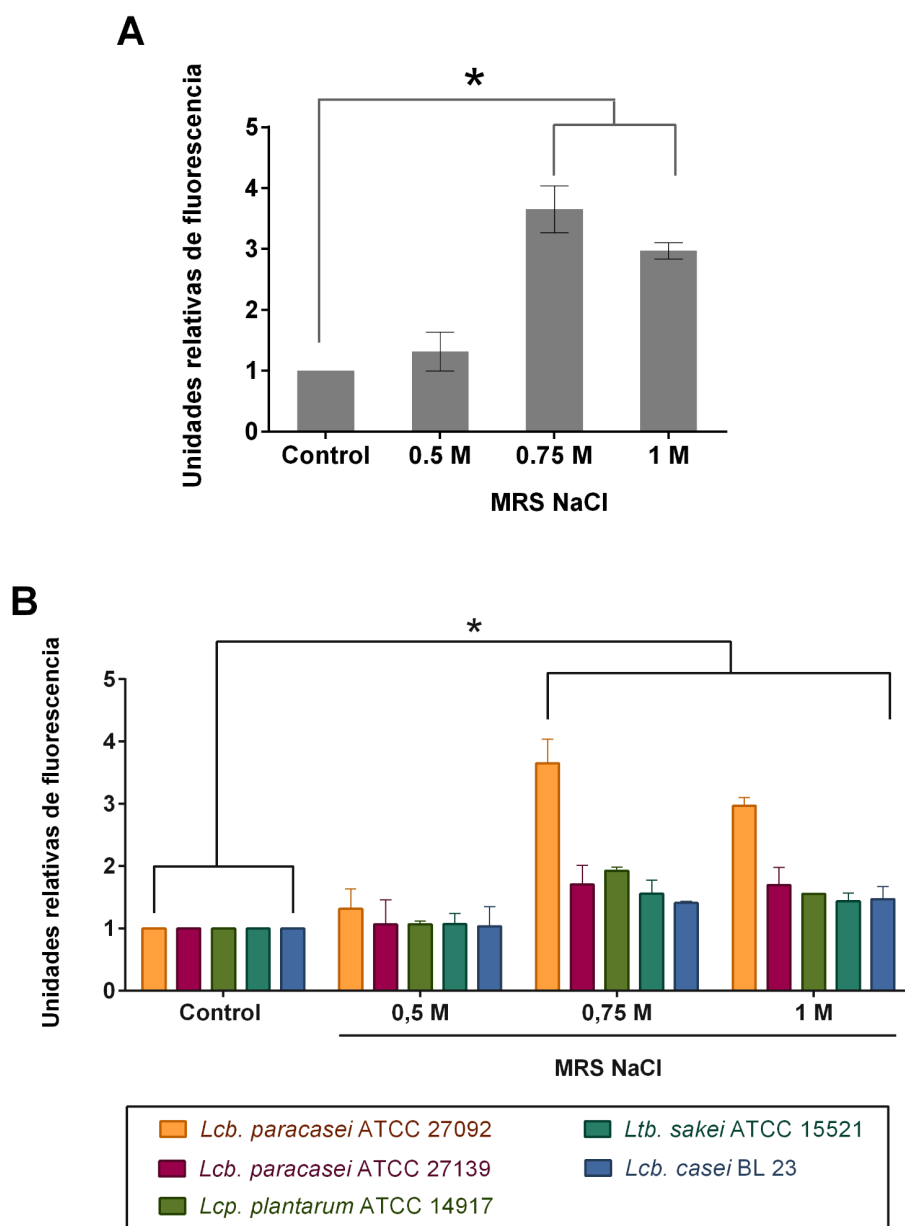


Figura 29. Análisis de unión bajo estrés osmótico. **(A)** Ensayos de unión después de que *Lcb. paracasei* ATCC 27092 se haya cultivado previamente en diferentes concentraciones de NaCl (NaCl= 0,5; 0,75 y 1M). **(B)** Ensayos de unión en *Lcb. paracasei* ATCC 27092, *Lcb. paracasei* ATCC 27139, *Lcp. plantarum* ATCC 14917, *Ltb. sakei* ATCC 15521 y *Lcb. casei* BL 23 después de que las células se cultivaron previamente en diferentes concentraciones de NaCl (0,5 M, 0,75 M y 1 M). El asterisco (*) indica un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia relativa en comparación con las células de control ($p < 0,05$).

3.2 Análisis por microscopía confocal de fluorescencia

Además del análisis por citometría de flujo, la exhibición de GFP-CBDLys también fue cuantificada en *Lcb. paracasei* ATCC 27092 a partir de microscopía de súper resolución *Airyscan*. Para ello, se tomaron imágenes de los microorganismos en crecimiento control y en medio suplementado con NaCl 0,75 M NaCl, en su plano medio para medir la intensidad de fluorescencia a nivel de la pared celular. Los resultados revelaron un aumento significativo en la capacidad de unión cuando la cepa fue cultivada en alta salinidad (Figura 30B). Por otro lado, se adquirieron imágenes de transmisión y confocales para estudiar si el crecimiento en NaCl afecta la morfología celular. En la Figura 30A, puede observarse que las células expuestas a estrés osmótico presentaron cambios notorios en su morfología en comparación con las células control, apreciando una desviación de la morfología bacilar típica. Se analizaron parámetros morfológicos como el área celular y la relación de aspecto, definida como la relación entre los ejes mayor y menor de las células bacterianas que proporciona un índice de circularidad. Los resultados mostraron que el área celular se conservó tanto en condiciones de control como de NaCl ($1,74 \pm 0,42 \mu\text{m}^2$ frente a $1,72 \pm 0,50 \mu\text{m}^2$, respectivamente), sin embargo, se observó una relación de aspecto significativamente menor cuando las células se cultivaron en un medio con alto contenido de sal (control: $2,87 \pm 0,53 \mu\text{m}$ frente a NaCl: $2,03 \pm 0,46 \mu\text{m}$), lo que indica una morfología más redondeada inducida por el crecimiento en alta sal.

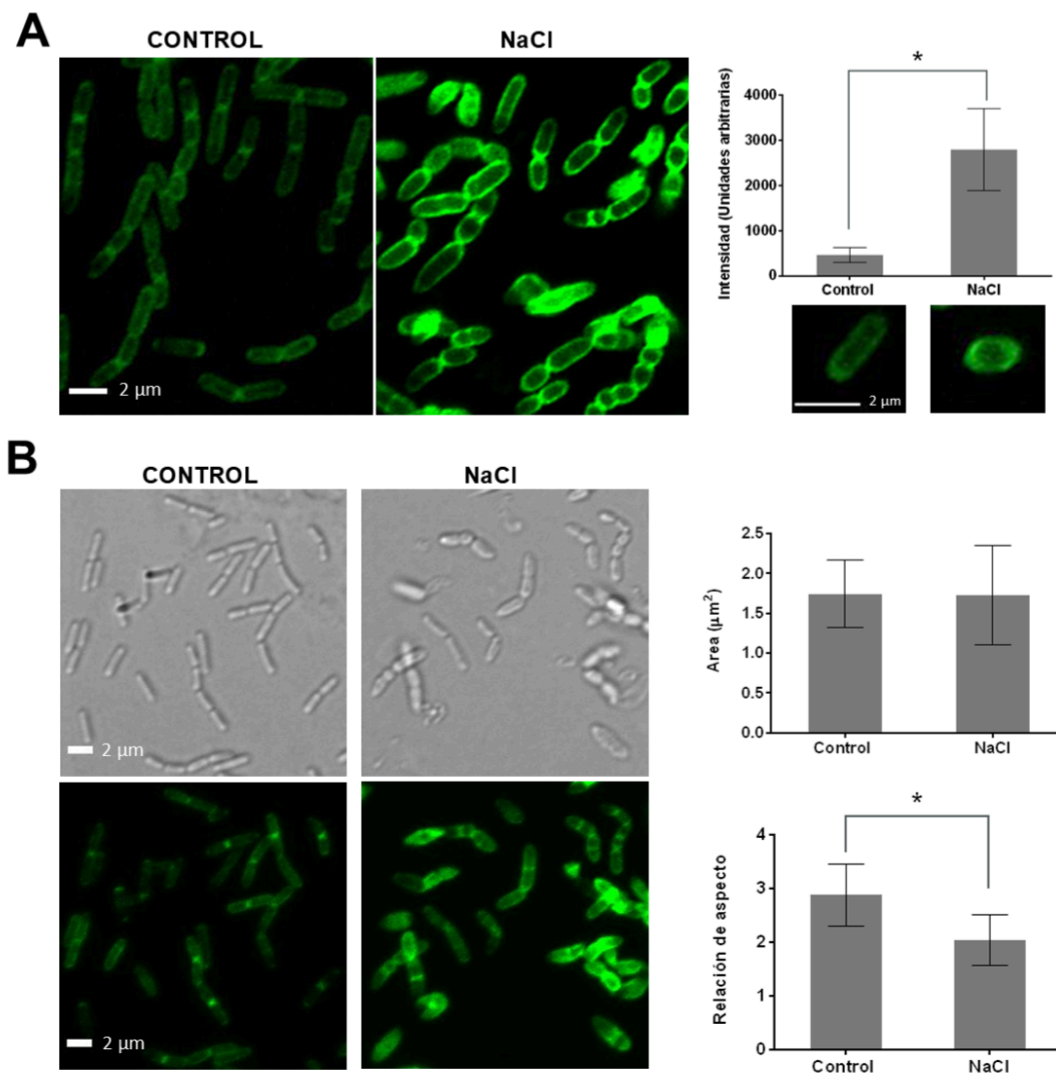


Figura 30. Análisis de unión y morfología en *Lcb. paracasei* bajo estrés osmótico. **(A)** Imágenes representativas de superresolución Airyscan del plano medio de las células. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia reveló un aumento significativo en la capacidad de unión cuando la cepa se cultiva previamente en alta salinidad (panel derecho). Las imágenes de fluorescencia se muestran con los mismos ajustes de visualización para permitir la comparación entre ellas. **(B)** Análisis morfológico. Imágenes representativas de transmisión y proyección z de intensidad máxima de células de control y tratadas con NaCl. Las imágenes de fluorescencia se muestran con los mismos ajustes de visualización para permitir la comparación. Todos los valores representan la media $\pm$ DE (desviación estándar) de al menos tres experimentos independientes. Se aplicó la prueba t de Student para muestras pareadas, considerándose significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

A pesar de las diferencias morfológicas observadas, no se detectaron cambios significativos en el área de los bacilos. Esto llevó a proponer que el aumento en la intensidad, atribuido a un mayor anclaje de la proteína en estudio, se debe a modificaciones en la envoltura celular inducidas por el estrés osmótico.

3.3 Modificaciones en la envoltura de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 por estrés osmótico

Para profundizar en el estudio de las modificaciones que ocurren en la superficie de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 durante la adaptación a condiciones de alta salinidad y su impacto en la exhibición de proteínas mediada por CBDLys, se realizó un análisis bioquímico detallado de la arquitectura de la envoltura celular.

Con este propósito, se realizó una extracción de componentes de pared de forma diferencial en *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Para ello, el microorganismo fue crecido en dos condiciones distintas, por un lado la condición control (MRS) y por otro la condición de estrés osmótico (MRS suplementado con NaCl 0,75 M). Específicamente se cuantificó el peptidoglicano (PG), los polisacáridos de la pared celular (CWPS) y los ácidos lipoteicoicos (LTA) de células cultivadas en condiciones control y con NaCl 0,75 M.

En comparación con los cultivos control, las células cultivadas en condiciones de alta salinidad mostraron una reducción de 2,03 veces en el contenido de PG. De igual manera, los niveles de CWPS y LTA disminuyeron 1,75 veces y 3,14 veces, respectivamente (Tabla 5). En base a los resultados obtenidos y al aumento de la unión del dominio de anclaje, en condiciones de alta salinidad, podría pensarse que una matriz de PG desprovista de polímeros secundarios de pared podría facilitar la unión de nuestra proteína al exponer un mayor número de sitios de unión. No obstante, es importante considerar que modificaciones químicas del PG, como las variaciones en la O-acetilación, también podrían desempeñar un papel clave en la modulación de la eficiencia de unión observada.

TABLA 5. Estructura de la envoltura celular crecida bajo condición de control MRS y crecida bajo condición de alta salinidad MRS NaCl 0,75 M

Condición	CW (g)	PG (g)	CWPS (g)*
<i>Lcb. paracasei</i> ATCC 27092	0,1415 ± 0.001	0,0059 ± 0.001	0,0035 ± 0.001
<i>Lcb. paracasei</i> ATCC 27092 NaCl 0,75 M	0,043 ± 0.001	0,0029 ± 0.001	0,002 ± 0.001

* Peso húmedo de las muestras de CWPS

La cuantificación de LTAs se realizó por medio de la estimación de la cantidad de fósforo. Se observó que hay una disminución significativa en el contenido de fósforo en los LTA obtenidos de microorganismos crecidos en NaCl 0,75 M. Los resultados se muestran en la tabla 6

Tabla 6. Medición de fósforo de LTA. T-test, P < 0,05

Muestra	LTA (mg P/g PS)
<i>Lcb. paracasei</i> ATCC 27092	1,146 ± 0,297
<i>Lcb. paracasei</i> ATCC 27092 NaCl 0,75 M	0,364 ± 0,156

Para explorar esto, se realizaron ensayos de Dot Blot de PG analizando la densidad relativa integrada (RID) de tres preparaciones diferentes de PG: extraído de células control, extraído de células control y posteriormente desacetilado químicamente con NaOH y extraído de células crecidas en alta sal, a una concentración de saturación (0,3 µg). Como se muestra en la Figura 31A, el PG purificado de células cultivadas en condiciones de alta sal exhibió de forma consistente intensidades de fluorescencia más altas que el PG control. Estas tendencias se confirmaron en el ensayo de saturación (Figura 31B), donde tanto las muestras de PG provenientes de células adaptadas a NaCl como las desacetiladas de manera química mostraron una unión significativamente mayor que el control. La señal intermedia obtenida con el PG desacetilado químicamente sugiere que, si bien la eliminación del grupo O-acetilo mejora la accesibilidad del ligando, otros cambios estructurales también pueden contribuir a una mayor unión de CBDLys. A continuación, con el fin de validar que un PG purificado en condiciones de estrés presenta un menor grado de acetilación, se cuantificaron los niveles de O-acetilación

mediante un ensayo colorimétrico. El PG extraído del *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC 27092 cultivado en alto contenido de sal. presentó un nivel de O-acetilación significativamente menor ($A_{500nm} = 0,137 \pm 0,066$) en comparación con la condición control ($A_{500nm} = 0,588 \pm 0,137$), lo que confirma que el estrés osmótico produce una reducción en la O-acetilación de PG y, por lo tanto, esta modificación podría mejorar la accesibilidad de la proteína de anclaje (Figura 31C). Con el fin de validar hipótesis de que la composición de los CWPS (polisacáridos de la pared celular) se ve afectada por el estrés osmótico, cuantificamos el contenido de ramnosa en los extractos de pared celular de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 cultivado en condiciones de control y en MRS con NaCl. Las células cultivadas en medio suplementado con NaCl mostraron una reducción significativa en el contenido de ramnosa respecto a la condición control. Los valores disminuyeron de $10,15 \pm 0,81$ μ g de ramnosa por 100 μ g de peso seco de pared celular en condiciones de control a $5,89 \pm 1,59$ μ g bajo estrés salino (Figura 31D).

Finalmente, para investigar más a fondo las modificaciones superficiales en *Lcb. paracasei* ATCC 27092 durante la adaptación a condiciones de alta salinidad, se realizó un análisis de expresión génica dirigido a enzimas clave implicadas en la biosíntesis de polímeros de la pared celular. Específicamente, se analizó la expresión de tres genes putativos implicados en la síntesis de polímeros de la pared celular: *ltaS* (LTA sintasa), *oafA* (PG O-acetilasa) y *wcaA* (glicosiltransferasa). Los resultados de la qPCR indicaron que los niveles de expresión de *ltaS*, *oafA* y *wcaA* fueron 18,7, 6,3 y 1,6 veces mayores, respectivamente, en la condición control, en comparación con las condiciones de alta salinidad. La reducción de la expresión de *ltaS* concuerda tanto con la disminución observada en los niveles de LTA, como en la diferencia en la cuantificación de fósforo entre una condición y otra. Además, la disminución de la expresión de *oafA* respalda la evidencia bioquímica de una menor O-acetilación de PG, mientras que la reducción de la expresión de *wcaA* sugiere una menor glicosilación de CWPS bajo estrés osmótico, lo que valida las evidencias bioquímicas en la disminución de los valores de ramnosa en CW. En general, estos hallazgos demuestran que el precrecimiento en condiciones de alta salinidad induce cambios estructurales en la superficie bacteriana, lo que resulta en una mayor capacidad de unión de la proteína de anclaje CBDLys.

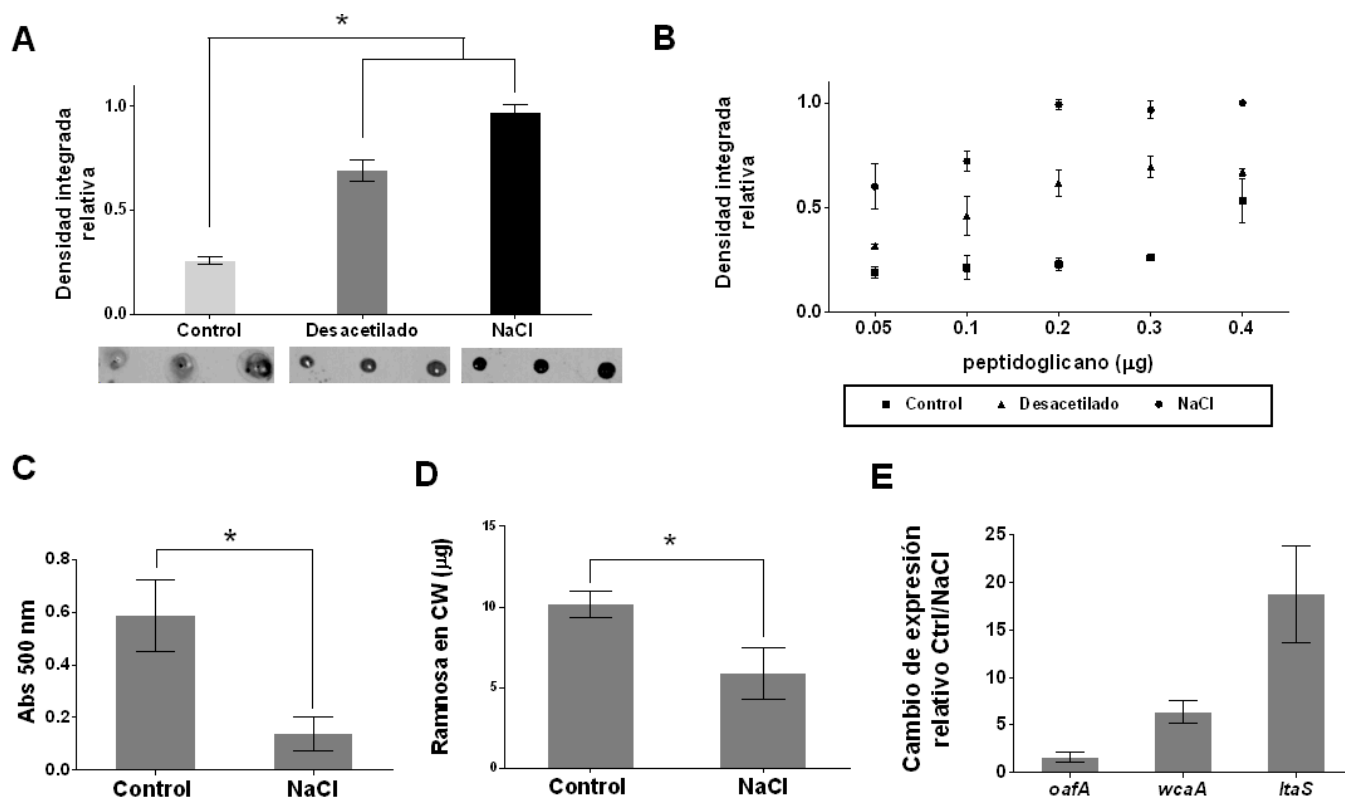


Figura 31. Análisis de la envoltura celular bajo estrés osmótico. **(A)** Densidad Integrada Relativa (RID) para tres tipos diferentes de muestras de PG. Se muestran diferencias significativas en comparación con el control, tanto para el PG obtenido de cepas cultivadas en condiciones de alta salinidad como para el PG desacetilado químicamente. **(B)** Curvas de saturación de unión comparando PG en condiciones de control, desacetilación química y suplementación con NaCl.

La intensidad de unión se cuantificó mediante densitometría **(C)** Cuantificación de las O-acetilaciones del PG en condición control y condición de alta salinidad. **(D)** Cuantificación de las ramnosas en CW en condición control y condición de alta salinidad. **(E)** Expresión relativa de genes implicados en la modificación de la envoltura celular (*oafA*, *wcaA* y *ltaS*), cuantificada mediante qRT-PCR. Los resultados se expresan como cambio relativo (Control/NaCl). Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

3.4 Análisis estructural de las interacciones entre CBDLys y el peptidoglicano: estudio *in silico*

Para caracterizar las interacciones entre la proteína *carrier* y el PG, y evaluar su modulación bajo estrés osmótico, se predijo la estructura tridimensional de la proteína y se realizaron ensayos de docking molecular. En primer lugar, a partir del modelo 3D de GFP-CBDLys generado por *AlphaFold*, se observó que la estructura de GFP fue predicha con alta confianza, mostrando una conformación similar a las estructuras reportadas en el servidor PDB (Shu et al., 2007). En cambio, para CBDLys, la región inicial conectada a GFP presentó baja confianza. El análisis del *Predicted Alignment Error* (PAE) indicó que GFP y CBDLys constituyen dominios estructuralmente independientes y no interactúan entre sí (Figura 32B).

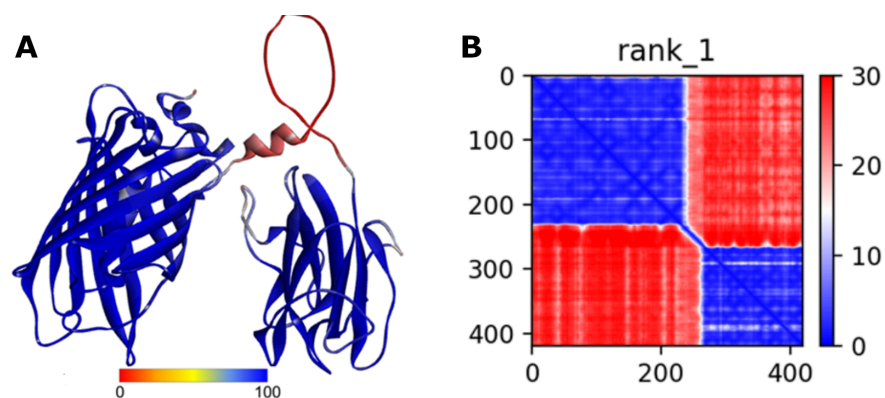
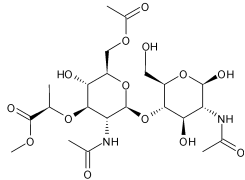
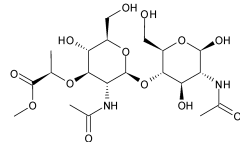
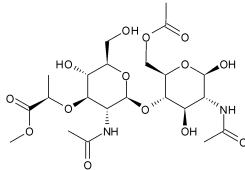
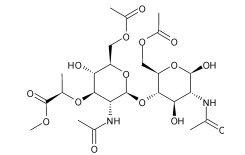


Figura 32. Predicción de la estructura de GFP-CBDLys. **(A)** El mejor modelo predicho para GFP-CBDLys está coloreado de acuerdo con los puntajes del *Predicted Local Distance Difference Test* (pLDDT) (La barra de colores, donde el azul indica la mayor precisión y el rojo la menor). **(B)** Gráfico PAE que muestra el nivel de confianza en las posiciones relativas de los residuos (PAE bajo representa alta confianza = azul, mediana = blanco, PAE alto representa baja confianza = rojo)

Como se demostró anteriormente, el nivel de acetilación de PG influyó en la capacidad de unión de nuestra proteína de anclaje, observándose una mayor afinidad por PG desacetilado mediante tratamiento con NaOH—una condición que podría emular el estrés osmótico en términos de composición de la pared celular. Para profundizar en el mecanismo molecular que subyace a la interacción entre GFP-CBDLys y el PG, se llevaron a cabo estudios de *docking* entre CBDLys y diversos ligandos con distintos patrones de acetilación en la posición C6 (Tabla 7) aplicando

una estrategia de *docking* ciego (*blind docking*), debido a la ausencia de información previa sobre posibles *hot spots* de unión en CBDLys.

TABLA 7. Estructura de disacáridos NAM-NAG con diferentes acetilaciones de C6

#	Estructura
Ligando 1	
Ligando 2	
Ligando 3	
Ligando 4	

Mediante análisis con DBSCAN fue posible identificar sitios preferenciales de unión. La ventaja de este método es que no requiere un valor inicial para determinar los clústeres, lo que lo hace robusto para el manejo de valores atípicos (ruido) (Amela et al., 2010; Chattopadhyay et al., 2023; Stevenson et al., 2023). Observamos que el agrupamiento óptimo ocurre cuando la distancia centroide (ϵ) se estableció en 2,5 y el número mínimo de poses requeridas para formar un clúster (Mpt) fue 2. Esto resultó en un total de 6 a 10 clústeres, con menos de 5 poses clasificadas como ruido.

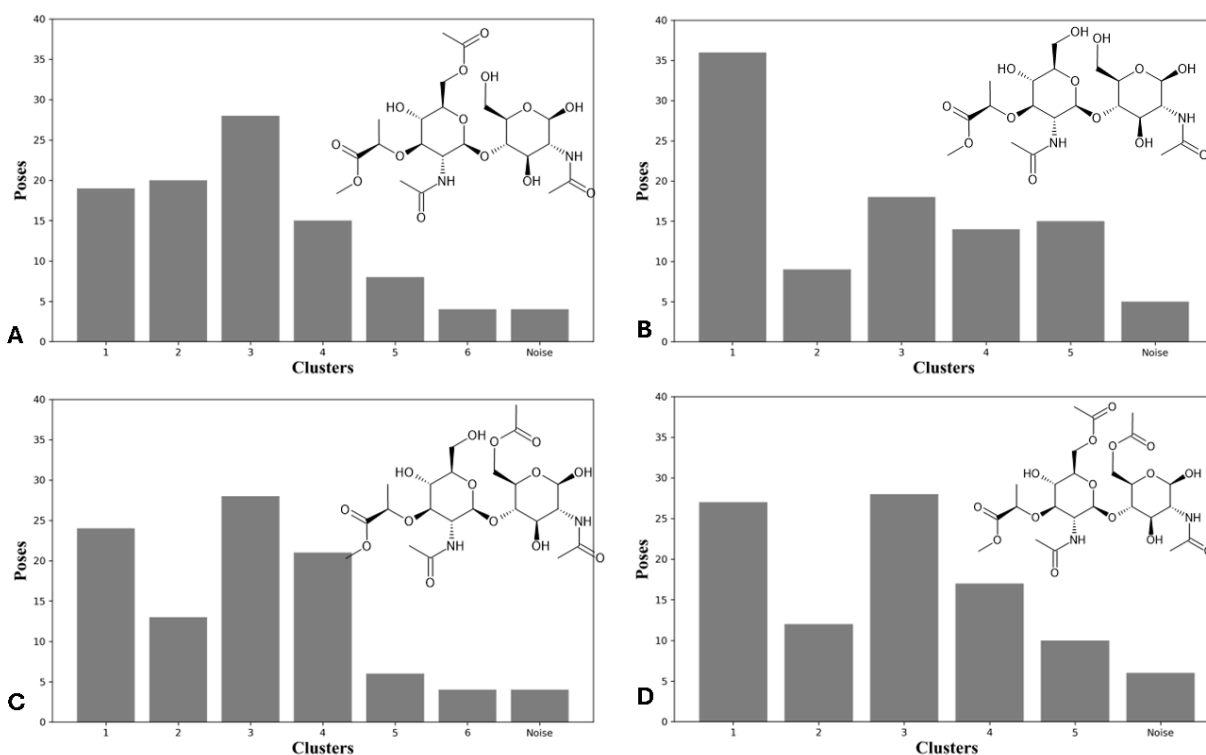


Figura 33. Número de poses por *cluster*. (A) Ligando 1, (B) Ligando 2, (C) Ligando 3 y (D) Ligando 4.

Al evaluar el número de poses por clúster (Figura 33), el ligando 2 (forma desacetilada) mostró solo un clúster representativo, mientras que los ligandos 1, 3 y 4 mostraron 2 o más clústeres representativos. En general, las posiciones representativas de estos ligandos interactúan con tres puntos calientes distintos en la CBDLys (Figura 34). En general, las poses representativas de estos ligandos interactuaron con tres sitios preferenciales distintos en CBDLys. Los ligandos 1 (NAM-acetilado), 3 (NAG-acetilado) y 4 (diacetilado) no mostraron un sitio de unión preferido, lo que sugiere patrones de interacción promiscuos, mientras que el ligando 2 (desacetilado) presentó una marcada preferencia por el sitio A (Figura 34). Esta afinidad preferencial se ve respaldada por un análisis detallado de las interacciones. En consonancia, el análisis de los enlaces de hidrógeno en las regiones A–C reveló que el ligando 2 establece contactos específicos en la región A con residuos como Asn267, Phe288, Ser415 e Ile413. En contraste, los ligandos 1, 3 y 4 mostraron patrones de interacción más amplios y distribuidos en múltiples regiones, mientras que las diferencias entre los clústeres fueron mínimas, indicando promiscuidad en la selección del sitio de unión (Figura MS4, MS5 y MS6). Estos resultados

refuerzan la hipótesis de que la desacetilación promueve una unión específica a sitios definidos, lo que probablemente contribuye a la mayor afinidad observada experimentalmente.

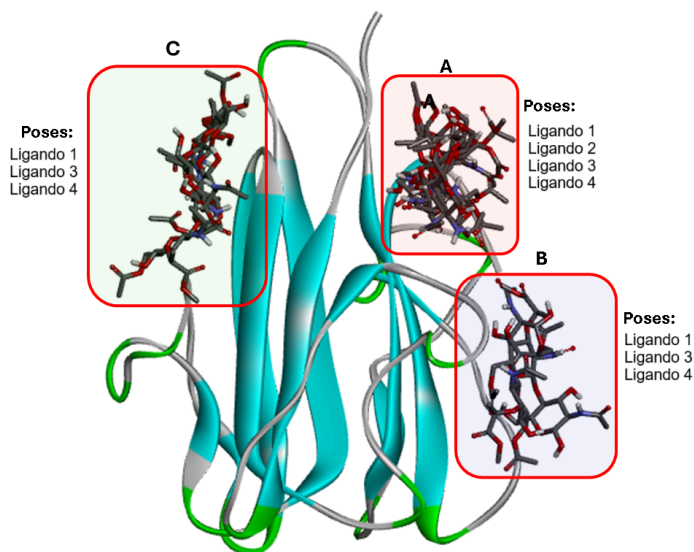


Figura 34. Regiones identificadas a partir de los grupos más poblados de cada ligando

3.5 Cinética de Adsorción del fago PL-1

El estudio de fagos de bacterias ácido lácticas, siempre ha despertado interés debido a las grandes pérdidas económicas que puede causar en la industria láctea. Por otro lado, es sabido que los bacteriófagos de BAL suelen reconocer receptores específicos que contienen azúcares en la superficie bacteriana, lo que permite una alta selectividad en el reconocimiento del hospedador (Ishibashi et al., 1982; Yokokura, 1977). Para evaluar si las modificaciones en la envoltura celular inducidas por el crecimiento en alta salinidad y/o la decoración con CBDLys afectan las interacciones fago-hospedador, se analizaron las cinéticas de adsorción del fago PL-1 en células de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 bajo diferentes condiciones. En primer lugar se analizaron la cinéticas de adsorción de *Lcb. paracasei* 27092 vs su fago específico PL-1 (Figura 35A), y de *Lcb. paracasei* decorado con la proteína ancla (Figura 35B).o se observaron diferencias entre ambas cinéticas.

A continuación, se realizaron los ensayos de adsorción utilizando células de *Lactocaseibacillus paracasei* cultivadas bajo condiciones de estrés osmótico (Figura 35 C–D). Los resultados de la cinética de adsorción mostraron que el crecimiento en alta salinidad provoca una disminución

significativa en el porcentaje de adsorción del fago en comparación con las condiciones control. Esta reducción se observó en todos los tiempos analizados, independientemente de que las células estuvieran decoradas o no con el dominio ancla. En particular, se sabe que fagos de BAL como J1 y PL-1 reconocen residuos de L-ramnosa en la pared celular de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 (Dieterle et al., 2014). Por lo tanto, la reducción en la adsorción observada en células adaptadas a sal se correlaciona con la disminución en la expresión de *wcaA*, un gen que codifica una glicosiltransferasa putativa implicada en la biogénesis de la pared celular, y concuerda con el análisis bioquímico que mostró un menor contenido de ramnosa en la pared celular (Figura 31D). Esto sugiere una posible alteración en la presentación de ramnosa en la superficie bacteriana y, en consecuencia, una menor disponibilidad de receptores para el fago. No obstante, la decoración con la proteína carrier no causaría ningún efecto en la adsorción del fago, dado que las cinéticas entre la cepa decorada y no decorada resultaron similares.

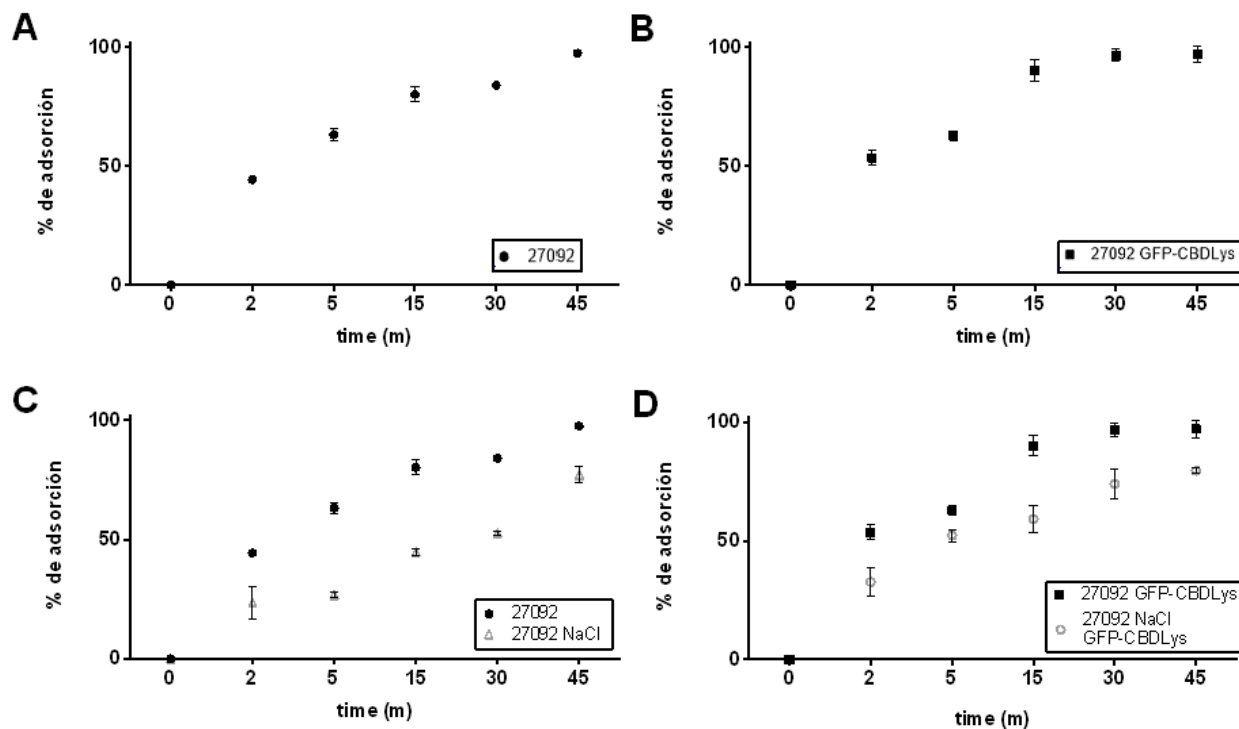


Figura 35. Cinética de adsorción. **(A)** *Lcb. paracasei* 27092 crecido en MRS (condiciones control) fue infectada con el bacteriófago PL-1. **(B)** *Lcb. paracasei* 27092 crecido en MRS fue decorada con GFP-CBDLys e infectada con el bacteriófago PL-1. **(C)** *Lcb. paracasei* 27092 crecido en NaCl 0.75 fue infectada con PL1. La cinética de adsorción se comparó con las condiciones control. **(D)** *Lcb. paracasei* 27092 crecido en NaCl 0.75 y posteriormente decorada con GFP-CBDLys e infectada con el bacteriófago PL-1. La cinética de adsorción se comparó con las condiciones control decoradas con la proteína quimérica.

3.6 Conclusiones capítulo 3

- Se observó un aumento significativo, de aproximadamente tres veces, en la capacidad de unión de la proteína ancla cuando *Lcb. paracasei* ATCC 27092 fue cultivado bajo estrés osmótico inducido por la adición de 0,75 M de NaCl al medio MRS. Este efecto también se evidenció en las otras cepas analizadas; no obstante, la unión fue consistentemente mayor en *Lcb. paracasei* ATCC 27092.
- Los resultados de microscopía se complementan con los resultados obtenidos por la citometría. Al estudiar los cambios en la morfología no se observaron cambios en el área, lo que sugiere que el aumento en la unión podría estar ocasionado por cambios a nivel de la envoltura propios de la adaptación a las condiciones de estrés.
- El crecimiento de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 bajo condiciones de estrés osmótico desencadena una remodelación estructural de su envoltura celular, caracterizada por una reducción significativa en el contenido de CWPS y ácidos lipoteicoicos. Esta reorganización se acompaña de una disminución en el grado de O-acetilación del PG, lo que mejora la accesibilidad de los sitios de unión para la proteína de anclaje CBDLys. La evidencia bioquímica fue respaldada por análisis de expresión génica, que revelaron una regulación negativa de genes clave implicados en la biosíntesis de estos componentes. Los ensayos de docking molecular complementaron las evidencias bioquímicas y revelaron que la afinidad de unión resultó influida por el grado de acetilación del PG, siendo el ligando desacetilado el que presentó una mayor especificidad por un sitio de unión definido.
- Los estudios de interacción fago-bacteria, mostraron que cuando *Lcb. paracasei* es crecido en alta salinidad, los cambios inducidos en la envoltura celular, particularmente la disminución en ramnosas, afectan la capacidad del fago para reconocer sus receptores específicos. Esta alteración en la composición de la superficie bacteriana provoca una disminución en la eficiencia de adsorción y, por consiguiente, un retardo en el inicio del proceso infeccioso.

Capítulo 4

Aplicaciones de la plataforma de exhibición de proteínas heterólogas a través de los dominios CTSlpA y CBDLys: estudio de propiedades de adhesión, conservación y exhibición de β -galactosidasa sobre la superficie de BAL

Las bacterias ácido lácticas son vehículos prometedores para la exhibición en superficie de biomoléculas, en general, el fin de tal exhibición consiste en administrar moléculas activas a los tejidos y a las mucosas. Entre las potenciales aplicaciones de la administración de moléculas a las mucosas impulsadas por BAL, se encuentra el control de la enfermedad inflamatoria intestinal, la generación de vacunas orales y el manejo de enfermedades autoinmunes. Debido a este potencial, las estrategias para la presentación de proteínas en la superficie de las BAL están cobrando interés. En los capítulos anteriores se abordó la caracterización de los dominios CTSlpA y CBDLys como dominios de anclaje a la superficie de las BAL, junto con el estudio de estrategias más seguras basadas en el crecimiento en presencia de NaCl, destinadas a incrementar la capacidad de unión. Asimismo, se analizaron las modificaciones estructurales de la envoltura celular asociadas a estas condiciones de crecimiento y que favorece la exhibición de proteínas heterólogas. Es por eso, que es de vital importancia, evaluar propiedades y parámetros que permitan avanzar hacia la aplicación efectiva del sistema propuesto. En el presente capítulo, se analizará el comportamiento de las BAL decoradas en ensayos de adhesión a mucosas. La evaluación de estas propiedades resulta fundamental ya que se espera que el vehículo utilizado alcance las mucosas y permanezca en ellas el tiempo suficiente para ejercer su acción.

Por otro lado, en este capítulo se evaluará el comportamiento de las BAL decoradas en relación con su preservación, abordando distintas estrategias de almacenamiento. La viabilidad de los probióticos constituye un aspecto crítico, ya que garantiza la conservación de sus efectos beneficiosos durante el almacenamiento, el procesamiento y el tránsito a lo largo del tracto gastrointestinal (Han et al., 2022). Finalmente, se propuso evaluar la versatilidad de los dominios de anclaje seleccionados analizando su capacidad para exponer proteínas heterólogas en la superficie bacteriana. Como modelo inicial, se utilizó la enzima β -galactosidasa de *Lactobacillus acidophilus*, dada su relevancia biotecnológica y su factible detección funcional, permitiendo establecer una primera validación del sistema.

4.1 Ensayos de Adhesión a mucinas

La capacidad de adhesión bacteriana es un criterio deseable a la hora de seleccionar bacterias probióticas. La unión de probióticos a la mucosa intestinal puede tener un papel protector potencial contra enteropatógenos a través de la competencia por los sitios de unión de la célula huésped. Además, la capacidad de adhesión de las bacterias probióticas podría aumentar la oportunidad de interactuar con el huésped resultando en una colonización temporal, aumentando su tiempo de tránsito en el intestino para ejercer sus efectos beneficiosos previstos (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Dentro de la mucosa intestinal se puede encontrar el glicocálix, el cual es una capa que contiene glucolípidos y glucoproteínas que recubre las células epiteliales del intestino. Su consistencia viscosa protege el epitelio intestinal de daños mecánicos y dificulta la colonización bacteriana, actuando como defensa frente a infecciones bacterianas. Esta capa mucosa está compuesta principalmente por proteínas glicosiladas, las mucinas, así como por glucolípidos, inmunoglobulinas y electrolitos (Bron et al. 2012).

Con el objetivo de evaluar la capacidad de adhesión de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 y *L. acidophilus* ATCC 4356, se realizaron ensayos *in vitro* de adhesión a mucinas en distintas condiciones. Para *Lcb. paracasei* 27092, se analizó su capacidad de adhesión comparando la cepa en distintas condiciones experimentales: células en condición control, células en condición control decoradas con GFP-CBDLys, células cultivadas bajo estrés osmótico y células cultivadas bajo estrés osmótico decoradas con GFP-CBDLys. Para *L. acidophilus* 4356, se evaluaron las siguientes condiciones: la cepa en su condición control, es decir, con su capa S nativa, La cepa depletada de su capa S y la cepa decorada con la proteína GFP-CTSlpA.

Estos ensayos permitieron determinar el impacto de la decoración con proteínas heterólogas en la adhesión bacteriana, así como también el efecto del estrés osmótico en relación a esta propiedad.

A partir de los recuentos realizados, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 36.

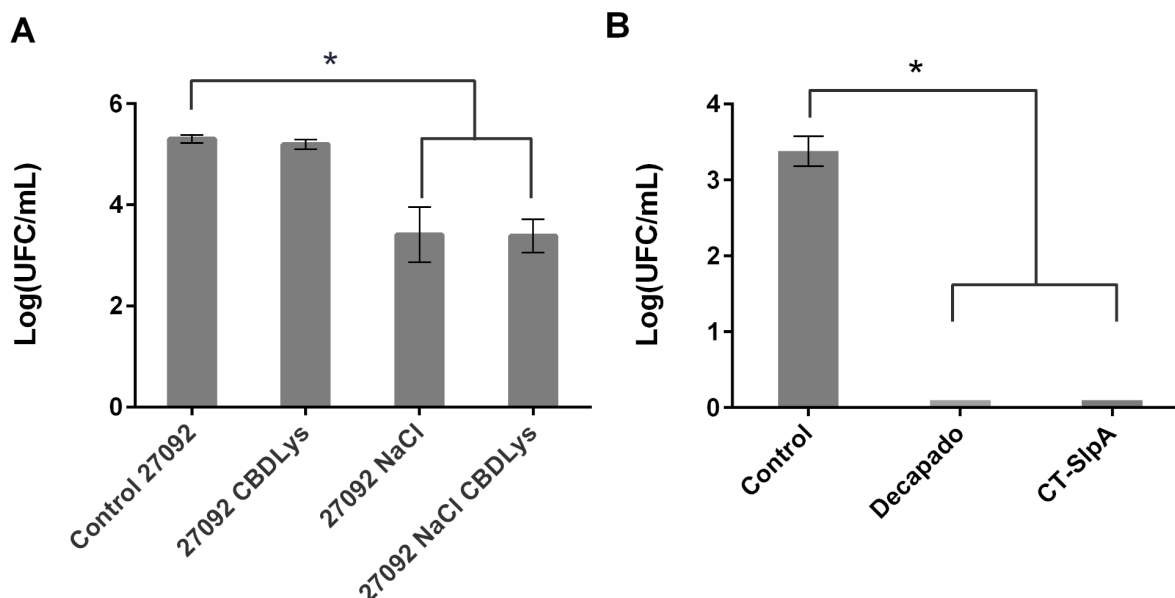


Figura 36. Ensayos de adhesión a mucinas, Log(UFC/mL) respecto a la condición evaluada. A) Recuento de viables de la adhesión de *Lcb. paracasei* 27092. Las medidas representan las medias $\pm$ la desviación estándar. El asterisco (*) indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la adhesión del lactobacilo cuando es precrecido en estrés salino y cuando es crecido en esta condición y posteriormente decorado con la proteína GFP-CBDLys. B) Recuento de viables de la adhesión de *L. acidophilus* ATCC 4356. Las medidas representan las medias $\pm$ la desviación estándar.

El porcentaje de adhesión celular se obtuvo relativizando las UFC/mL al control, tomando este como el 100%. Los resultados obtenidos, se muestran en la tabla 8

TABLA 8. Porcentajes de adhesión celular a mucinas *in vitro*

	Control	GFP-CBDLys	NaCl	NaCl GFP-CBDLys
<i>Lcb. paracasei</i> ATCC 27092	100 %	98 %	64 %	63,8%

	Control	Decapado	GFP-CTSlpA
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	100 %	0 %	0 %

A partir de los resultados obtenidos, se observa que tanto *Lacticaseibacillus paracasei* 27092 como *Lactobacillus acidophilus* 4356 presentan características propias de envoltura que favorecen la adhesión a mucinas. En *Lcb. paracasei*, se observó que la capacidad de adhesión se mantiene incluso cuando las bacterias están decoradas con la correspondiente proteína carrier (GFP-CBDLys). Sin embargo, se detectó una disminución significativa en la adhesión de 1.90 órdenes logaritmo, cuando la cepa fue cultivada en condiciones de alta salinidad, independientemente de la presencia de la proteína carrier. Resultados previos de esta tesis han demostrado que el crecimiento en alta salinidad induce modificaciones en la envoltura bacteriana, específicamente en lo que respecta a los polímeros secundarios de la pared celular y en el grado de acetilación del PG. Estos cambios podrían influir en la capacidad de adhesión a las proteínas mencionadas, lo que explicaría la reducción observada en el porcentaje de adhesión en comparación con las bacterias cultivadas en condiciones control.

En cuanto a *L. acidophilus* ATCC 4356, se ensayaron tres tipos celulares diferentes. La adhesión a mucinas únicamente se obtuvo cuando la célula conserva su capa S nativa. La *S-layer*, en particular, la proteína SlpA– juega un papel determinante en la adhesión al epitelio intestinal (Fina Martin, 2019). En *L. acidophilus*, la eliminación de SlpA reduce notablemente la unión a mucina in vitro, según Buck et al., 2005; Ramiah et al., 2009. Aunque otras proteínas de superficie influyen en la adhesión a mucinas, podría esperarse cierto grado de unión en la cepa sin *S-layer* o decorada con la proteína quimera, sin embargo, en nuestros resultados esta capacidad se ve afectada. Esto podría sugerir que la proteína SlpA estaría jugando un rol clave en la adhesión, y que el tratamiento con LiCl podría alterar otros factores de superficie, comprometiendo la unión.

4.2 Estudios de conservación: almacenamiento en frío y post-liofilización

En el estudio de probióticos, es fundamental garantizar su viabilidad, ya que estos microorganismos deben permanecer vivos para ejercer sus funciones beneficiosas. Por ello, nos propusimos analizar el impacto de distintas condiciones de almacenamiento en la viabilidad de las cepas decoradas con la proteína de anclaje.

En este sentido, se han estudiado dos estrategias de conservación celular como son la refrigeración (conservación a 4°C) y la liofilización en células de *Lacticaseibacillus paracasei*

ATCC 27092 crecidas en condición control y bajo estrés osmótico y decoradas con la proteína ancla GFP-CBDLys, evaluando los parámetros de retención del dominio de anclado y viabilidad. Las muestras liofilizadas fueron rehidratadas y se evaluaron su viabilidad

El monitoreo de la viabilidad se llevó a cabo durante 28 días, con un recuento inicial antes del almacenamiento y evaluaciones posteriores en los días 1, 7, 14, 21 y 28. Por otro lado, la retención del binding se analizó mediante citometría de flujo, registrando la fluorescencia a lo largo de un mes.

La figura 37 muestra los resultados de viabilidad y retención del binding de *Lcb. paracasei* 27092 decorada con GFP-CBDLys.

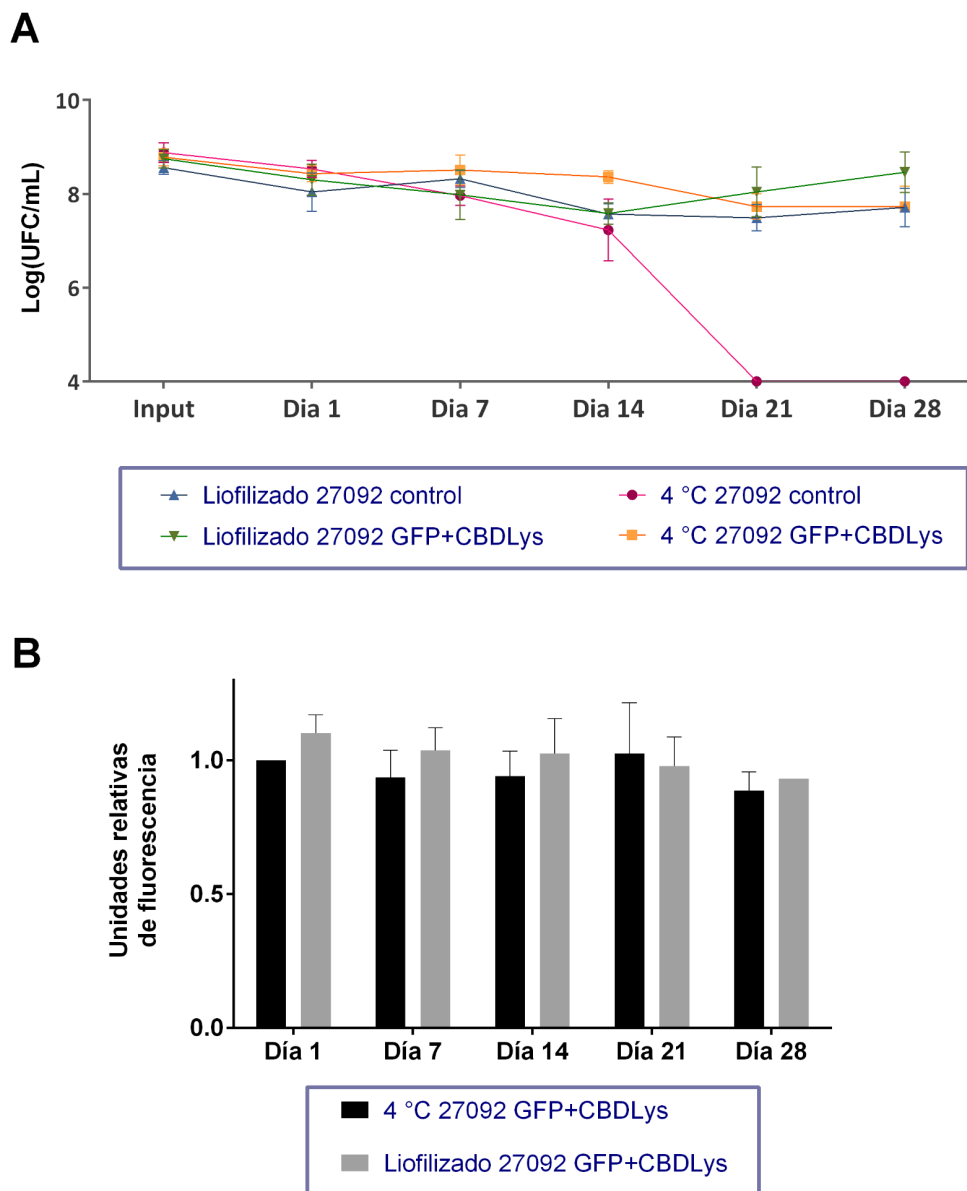


Figura 37. Viabilidad y retención del binding durante 28 días de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 crecido en condiciones estándar. **(A)** Recuento de *Lcb. paracasei* 27092 en log UFC/mL, según método de almacenamiento. Se comparó la viabilidad bacteriana según el tipo de almacenamiento y según los microorganismos están decorados o no con la proteína GFP-CBDLys. **(B)** Preservación de la fluorescencia en *Lcb. paracasei* 27092 decorado con GFP-CBDLys, almacenado a 4 °C o sometido a liofilización. Los valores de fluorescencia están relativizados al día 1. Las medidas representan las medias $\pm$ la desviación estándar.

En la figura 37 se destaca que en condiciones de crecimiento estándar, la fluorescencia se mantiene a lo largo de todo el periodo de estudio independiente de la forma de almacenamiento seleccionada.

En relación a la viabilidad, en cuanto a la forma de almacenamiento por liofilización, se observó que ambos tipos celulares (células tal cual y decoradas) conservaron la viabilidad a lo largo del tiempo. Además, en este caso, la capacidad de unión de la proteína de anclaje se mantiene sin diferencias significativas a lo largo del periodo de 28 días.

En cuanto al almacenamiento a 4°C se evidenciaron diferencias más marcadas entre ambos tipos celulares. Las células tal cual registraron una reducción significativa de 0,92 log UFC/ml a partir del día 7 con una pérdida total de la viabilidad detectada al día 21. En cambio, las células decoradas mostraron un comportamiento notablemente distinto: si bien presentaron un leve descenso en los recuentos, las células decoradas permanecieron viables durante todo el periodo ensayado. Al día 28 se evidenció una disminución de 1,06 log UFC/ml respecto al tiempo inicial.

En el capítulo anterior observamos que un crecimiento en alta sal favorecía la capacidad de pegado del dominio CBDLys, y este aumento estaba acompañado de un cambio en la arquitectura de la envoltura de *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Veremos ahora cómo esta condición de crecimiento impacta en la conservación de la viabilidad y en la estabilidad de unión de la proteína ancla en ambos métodos de almacenamiento. La figura 38 muestra los resultados de viabilidad celular y retención de la unión de células de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 precrecidas en estrés osmótico considerando ambos métodos de conservación.

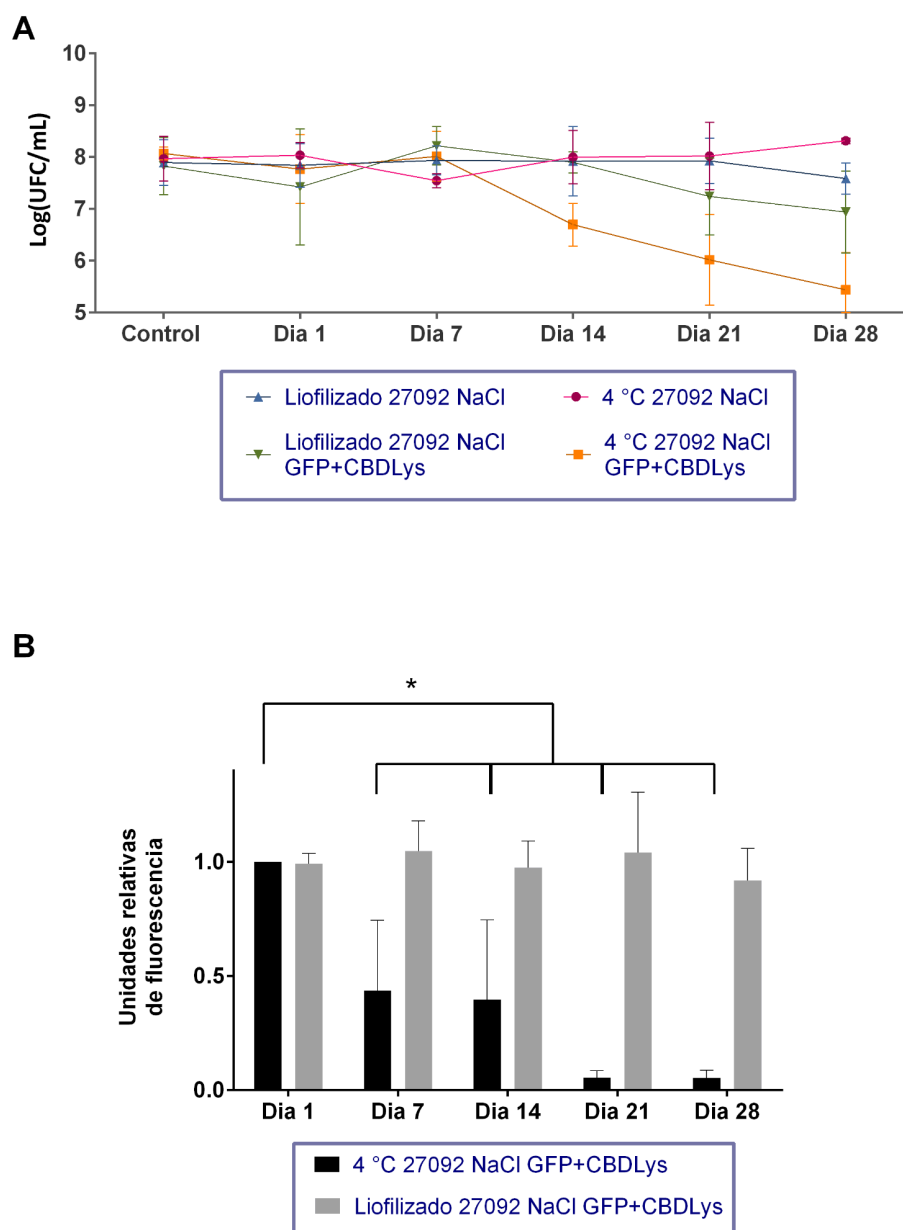


Figura 38. Viabilidad y retención del binding a lo largo de 28 días bajo estrés salino. **(A)** Recuento de *Lcb. paracasei* 27092 crecido en NaCl en log UFC/mL. Se comparó la viabilidad bacteriana según el tipo de almacenamiento y según los microorganismos están decorados o no con la proteína GFP-CBDLys. **(B)** Evaluación de la preservación de la fluorescencia semanalmente entre *Lcb. paracasei* 27092 crecido en NaCl decorado con la proteína GFP-CBDLys cuando se conserva a 4 °C y cuando es liofilizada. Las medidas representan las medias $\pm$ la desviación estándar. El asterisco (*) indica una diferencia significativa ($p < 0,05$)

En cuanto al almacenamiento por liofilización, las células tal cual y decoradas no mostraron diferencias significativas en cuanto a la viabilidad. Esto indica una estabilidad consistente bajo las condiciones analizadas. Se destaca también, que posterior a la liofilización, la retención del binding se mantiene sin diferencias significativas durante los 28 días que abarcan el periodo de estudio. En conjunto, estos resultados respaldan la eficacia del protocolo de liofilización empleado, tanto en términos de conservación de la viabilidad como de mantenimiento del sistema de exhibición proteica. Por otro lado, respecto al almacenamiento a 4 °C, se obtuvo que el crecimiento en condiciones de alta salinidad afecta tanto la retención del binding como la viabilidad a lo largo del período de estudio. Cuando las células son conservadas a 4 °C, la fluorescencia muestra una disminución significativa a partir del día 7 y se pierde completamente desde el día 21. En cuanto a la viabilidad, la cepa decorada sufre una disminución significativa a partir del día 14, llegando a una reducción máxima de 2,6 UFC/ml al día 28. Llamativamente, la cepa tal cual precrecida en alta sal mantiene los índices de viabilidad en todo el periodo estudiado. A continuación, en la tabla 9 se muestra una comparación entre la retención del binding y la viabilidad según el almacenamiento, según la condición de crecimiento y considerando o no la decoración.

TABLA 9. Viabilidad y retención del binding según el tipo de crecimiento y almacenamiento

	<i>Lcb. paracasei</i> 27092 control	<i>Lcb. paracasei</i> 27092 NaCl
Preservación de la unión de la proteína ancla (4 °C)	Se mantiene durante el periodo de estudio (28 días)	Disminución significativa desde el día 7. Pérdida a partir del día 21
Preservación de la unión de la proteína ancla. (Liofilizado)	Se mantiene durante el periodo de estudio (28 días)	Se mantiene durante el periodo de estudio (28 días)
Viabilidad (4 °C)	Disminución significativa desde el día 7 sin el ancla. Con el ancla sin diferencias significativas hasta el día 21	Se mantiene durante el periodo de estudio sin diferencias significativas sin el ancla. Con el ancla, se observan diferencias significativas en el día 14
Viabilidad (Liofilizado)	Con la proteína ancla presenta diferencias significativa en el día 28, sin el carrier se mantiene sin diferencias significativas por 14 días	Con y sin la proteína ancla se mantiene sin diferencias significativas durante el periodo de estudio
Lio o Crioprotección	No requiere	No requiere

Por lo tanto, los resultados resaltan la versatilidad de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 de poder ser almacenado de distintas formas (almacenamiento en frío o liofilización), según el objetivo del almacenamiento, el tiempo y/ o condición que se requiera.

4.3 Exposición de β -galactosidasa en superficie de BAL

4.3.1 Producción y caracterización de las proteínas de fusión β gal-CTSlpA y β gal-CBDLys

Con el fin de evaluar la exhibición de una enzima con actividad biológica a través de los dominios de anclado CTSlpA y CBDLys en la superficie de BAL, se diseñaron construcciones de fusión entre β -galactosidasa de *L. acidophilus* ATCC 4356 y ambos dominios.

Se produjeron las proteínas quimeras β gal-CTSlpA y β gal-CBDLys, como así también β gal sin dominio asociado (control), las cuales fueron expresadas utilizando *E. coli*, como sistema de expresión heterólogo. Las proteínas recombinantes fueron inicialmente caracterizadas mediante SDS-PAGE y Western Blot, confirmando su correcta expresión y tamaños esperados (Figura MS7 y MS8).

La actividad de β -galactosidasa se determinó mediante el ensayo clásico descrito por Miller (1972), utilizando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato cromogénico. La hidrólisis de ONPG por β -galactosidasa libera o-nitrofenol, cuya coloración amarilla en medio alcalino permitió monitorear cualitativamente la actividad (Figura 39). Las mediciones de absorbancia se realizaron a 420 nm, empleando fracciones no inducidas como controles negativos.

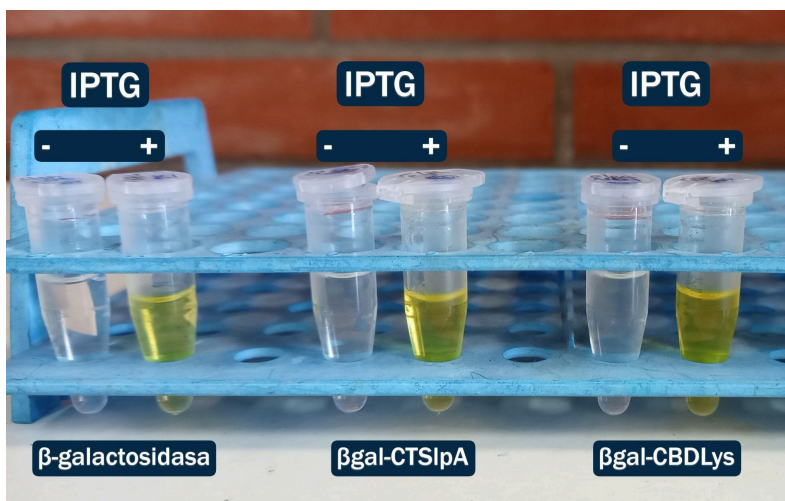


Figura 39. Visualización cualitativa de la actividad enzimática en fracciones solubles inducidas y controles no inducidos. Se señalan las fracciones inducidas por IPTG (+) y las no inducidas (-).

El análisis cualitativo confirmó actividad β -galactosidasa en las fracciones solubles de las tres construcciones. A continuación, se calculó la actividad específica de cada variante, según la ecuación 7. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10, evidenciándose que todas las proteínas de fusión mantenían capacidad catalítica.

Tabla 10. Resultados de actividad específica de β -galactosidasa para las construcciones en estudio

Actividad específica a 37 °C ($\mu\text{moles. m}^{-1}. \text{mg}^{-1}$)		
β -gal	$\beta\text{gal-CTSlpA}$	$\beta\text{gal-CBDLys}$
$28,45 \pm 2,62$	$33,73 \pm 10,50$	$48,23 \pm 11$

Estos resultados indican que las condiciones de inducción de la enzima permitieron obtener una proteína recombinante funcional. Por otro lado, se puede destacar, que la fusión de β -galactosidasa con ambos dominios de anclaje no compromete la funcionalidad enzimática, y que ambas construcciones resultan viables para su evaluación posterior como sistemas de anclaje en BAL.

4.3.2 Exposición de β -galactosidasa en superficie de BAL. Inmunofluorescencia y Citometría de flujo con marcaje por inmunofluorescencia

Confirmada la preservación de la actividad enzimática de la β -galactosidasa tras su fusión a los dominios de anclaje, el siguiente paso consistió en evaluar la capacidad del sistema para dirigir la exposición superficial de la enzima en bacterias ácido lácticas. Para ello, se implementaron ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo con marcaje por inmunofluorescencia, permitiendo visualizar y cuantificar la interacción de las proteínas de fusión con la superficie bacteriana, y así explorar la versatilidad del sistema como plataforma de anclaje funcional.

En el caso de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, la exhibición de la β -galactosidasa a superficie celular fue corroborada mediante dos metodologías: microscopía confocal y citometría de flujo. En la primera, luego de realizar un ensayo de unión con $\beta\text{gal-CTSlpA}$, las células fueron adheridas a cubreobjetos mediante tratamiento con concanavalina A, para

posteriormente realizar el ensayo de inmunofluorescencia con las células fijadas. La Figura 40 muestra distintas fotografías con señales fluorescentes rodeando los lactobacilos, consistentes con la localización superficial de la proteína de fusión anclada a través del dominio CTSIpA. Los controles de autofluorescencia no mostraron señal, confirmando la especificidad del marcaje.

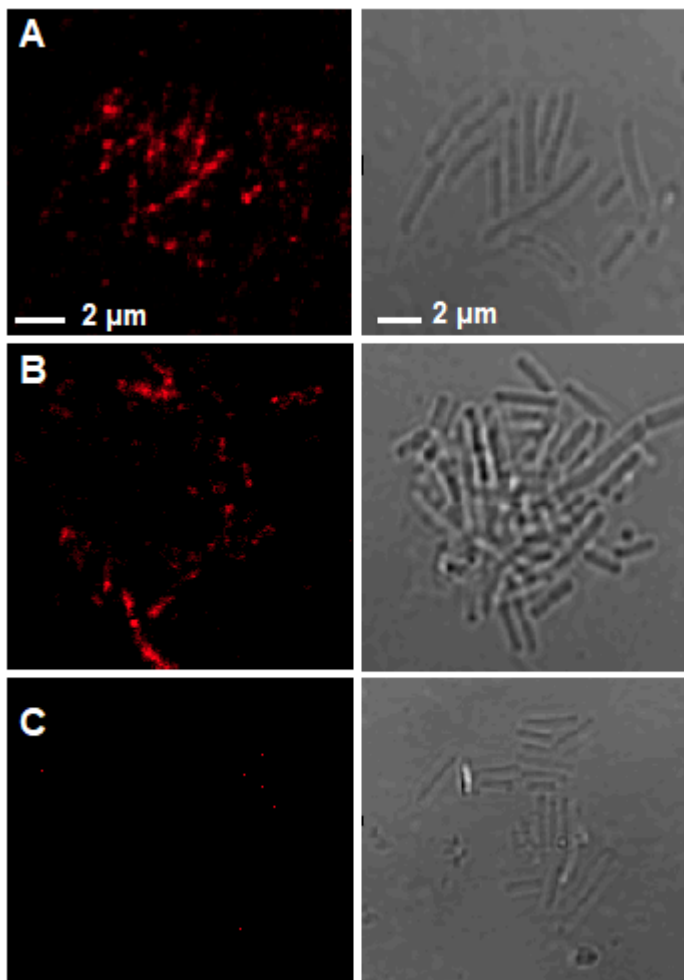


Figura 40. Inmunofluorescencia de *L. acidophilus* ATCC 4356 adheridos a superficie a través de concanavalina. **(A)** y **(B)** Se muestran dos campos diferentes donde se observó fluorescencia. **(C)** Control de autofluorescencia.

Los resultados obtenidos confirmaron la eficacia del sistema. A diferencia de algunos modelos eucariotas que se cultivan adheridos, las BAL —como la mayoría de las bacterias— deben ser adheridas al vidrio para aplicar el protocolo convencional de inmunofluorescencia. Además, los

numerosos pasos de lavado pueden provocar la pérdida de células bacterianas. Por ello, se buscó complementar este método con una estrategia en suspensión que facilite la manipulación y cuantificación de los microorganismos.

A continuación, en la Figura 41 se presentan los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. Estos datos corresponden a los ensayos de inmunofluorescencia en suspensión realizados sobre *L. acidophilus* ATCC 4356 (Figura 41A) y *Lcb. paracasei* ATCC 27092 (Figura 41B). Para esta etapa, se empleó la técnica de citometría de flujo con marcaje por inmunofluorescencia en células en suspensión, permitiendo no solo la detección de la señal fluorescente, sino también la cuantificación directa del porcentaje de células marcadas. Buscando así, preservar el número de bacterias durante todo el ensayo.

Con el fin de asegurar la especificidad del marcaje, se incluyeron distintos controles de autofluorescencia, verificando que las señales observadas correspondiera exclusivamente a la interacción de los anticuerpos con las proteínas de fusión ancladas en la superficie celular. Asimismo, se evaluaron distintas condiciones de bloqueo (0,5% a 5%) para minimizar uniones inespecíficas, y encontrar aquella que resulte óptima a cada sistema.

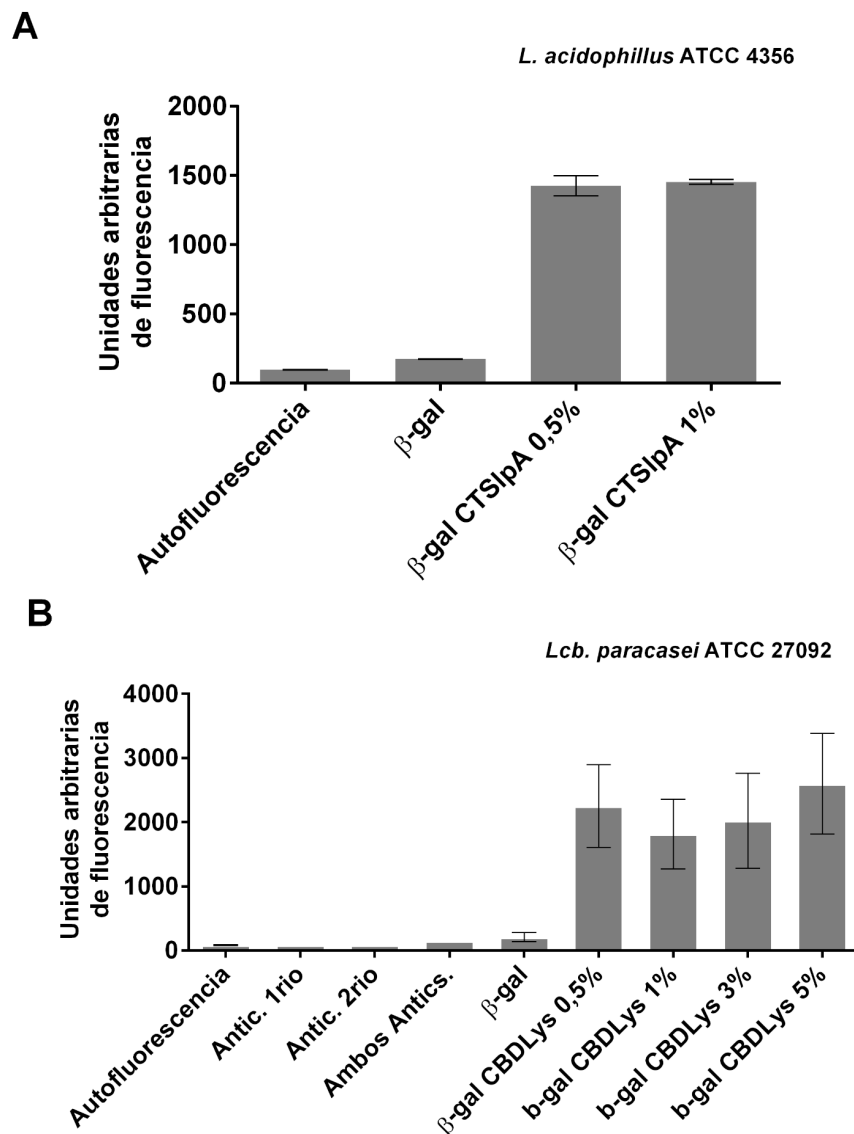


Figura 41. Fluorescencia cuantificada de la citometría de flujo para el ensayo de inmunofluorescencia en suspensión **(A)** Unidades arbitrarias de fluorescencia para los ensayos realizados sobre *L. acidophilus* ATCC 4356 **(B)** Unidades arbitrarias de fluorescencia para los ensayos realizados sobre *Lcb. paracasei* 27092.

En primer lugar se destaca que los controles realizados permitieron descartar unión inespecífica o falsos positivos. Respecto a las distintas condiciones de bloqueo evaluadas, no se observaron diferencias, por lo tanto se puede continuar los ensayos con la condición estándar, la cual es del 1%.

Finalmente, los resultados obtenidos fueron alentadores, observándose señales de fluorescencia hasta 50 veces superiores a los controles de autofluorescencia, lo que confirma la unión específica de las proteínas de fusión a la superficie bacteriana.

Sin embargo, el análisis del porcentaje de células marcadas por medio de la citometría de flujo, indicó que aproximadamente el 45% de las células de *L. acidophilus*, presenta señal positiva, ya sea de forma total o parcial y al menos el 20% en *Lcb. paracasei* presentaron señal positiva. Estos resultados demuestran que, si bien el sistema permite el anclaje superficial de la β -galactosidasa a través de los dominios de fusión, aún es necesario optimizar las condiciones experimentales a fin de poder corroborar de manera más eficiente el recubrimiento celular y maximizar la proporción de bacterias decoradas con la proteína de interés.

4.4 Conclusiones capítulo 4

- Los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión a mucinas evidencian que tanto *Lcb. paracasei* ATCC 27092 como *L. acidophilus* ATCC 4356 presentan características de superficie determinantes en su capacidad de adhesión. En *Lcb. paracasei*, la decoración con la proteína carrier GFP-CBDLys no afectó la adhesión bajo condiciones control, mientras que el cultivo en condiciones de estrés salino redujo significativamente esta capacidad, posiblemente asociado a modificaciones en la composición de la envoltura celular inducidas por la salinidad. Por su parte, en *L. acidophilus*, la presencia de la capa S resultó ser indispensable para la adhesión a mucinas, ya que tanto el tratamiento de depleción como la decoración con la proteína quimérica GFP-CTSIpA, que involucra una previa depleción de la capa S, no permitieron recuperar esta capacidad. Estos hallazgos aportan información relevante para el futuro diseño de estrategias de exposición de proteínas heterólogas en la superficie de probióticos y su relación con la capacidad de adhesión.
- Respecto a la preservación de las bacterias, se analizó la viabilidad de las mismas según el crecimiento (control y estrés salino) y el método de almacenamiento (frío o liofilización). Los resultados indicaron que, cuando las bacterias crecieron en condiciones estándar, el mejor método de preservación fue la liofilización. En el almacenamiento en frío, la viabilidad se conserva cuando las mismas están decoradas con la proteína quimera. Estos hallazgos sugieren que la proteína ancla podría ofrecer protección frente al estrés del almacenamiento en frío. Entre los métodos evaluados para preservar bacterias crecidas en alta salinidad, el almacenamiento a 4°C fue el más efectivo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre este método y los resultados obtenidos con la liofilización. Por otro lado, la capacidad de unión se mantuvo constante después de la liofilización, independientemente del método de cultivo utilizado.
- El estudio de la actividad enzimática arrojó que las fracciones solubles cuando son inducidas muestran actividad β -galactosidasa. En cuanto a los ensayos de inmunofluorescencia adhiriendo químicamente los lactobacilos a una superficie y la inmunofluorescencia en suspensión, indican que hay una población marcada, lo que indica que ambos carriers están permitiendo a los lactobacilos en estudio exhibir en su superficie a la enzima β -galactosidasa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los últimos años, diversos estudios han demostrado el gran potencial de exponer péptidos y otras moléculas en la superficie de bacterias ácido lácticas. Esto se realiza en aplicaciones tan variadas como el desarrollo de vacunas orales, la inmovilización de enzimas, bioconversión, etc. Estas bacterias destacan como vehículos de entrega por su estatus GRAS, además muchas cepas presentan propiedades probióticas. Emplear BAL sin modificarlas genéticamente garantiza la seguridad del sistema al mismo tiempo que permite exhibir una alta densidad de moléculas en la superficie, aprovechando las características benéficas de estos microorganismos (Bosma et al., 2006; Gordillo et al., 2020; Mao, Wu, et al., 2016; Ribelles et al., 2013; Uriza et al., 2020; Vasquez et al., 2022).

En el capítulo 1 de la presente tesis se demostró que el dominio carboxilo terminal de la proteína SlpA de *L. acidophilus* 4356 (CTSlpA), es capaz de unirse a la superficie de *L. acidophilus*. Para caracterizar funcionalmente este dominio, se lo fusionó a la proteína fluorescente GFP (GFP-CTSlpA), lo que permitió realizar un seguimiento de su unión a la envoltura bacteriana. La fusión resultó exitosa y confirmó tanto la capacidad de anclaje como la compatibilidad estructural del dominio para exhibir proteínas heterólogas. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar el CTSlpA como plataforma de anclaje para la exposición superficial de otras proteínas de interés biotecnológico en BAL, sin modificarlas genéticamente. De las BAL evaluadas, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 fue la que mostró mayor afinidad por la proteína ancla. Los mecanismos de interacción entre la proteína SlpA y la envoltura se encuentra descrito de dos maneras, por un lado se ha propuesto que la interacción de los aminoácidos básicos de la región C-terminal de la *S-layer* y los polímeros secundarios de carga negativa (LTA) sería responsable de mediar la unión a la pared celular. Por otro lado en *L. acidophilus* ATCC 4356 se ha confirmado experimentalmente que el dominio CT con ambos dominios SLAP se encuentra implicado en la interacción de SlpA con la pared celular. Este dominio explicaría la capacidad de tipo lectina de esta proteína al interaccionar con distintos componentes glicoconjugados de origen procariota (PG y LTA). Por lo tanto, dado que el blanco de interacción de SlpA son los LTA, puede pensarse que las diferencias en la composición de la envoltura de las BAL evaluadas determinan la selectividad del ancla hacia esta cepa.

Por otro lado, se logró demostrar la capacidad de exhibición del dominio alcanzando una densidad de $1,14 \times 10^6$ moléculas por célula. Este nivel de exposición es comparable al reportado en otros estudios que emplearon otros dominios de anclaje, como el dominio LysM y la

hidrolasa de superficie celular (CshA) los cuales también mostraron una capacidad de unión similar (Hu et al., 2010; Vasquez et al., 2022).

Es interesante destacar, que algunos sistemas de exhibición utilizan bacterias como partículas inertes donde se recurre a un tratamiento con el agente químico TCA, para maximizar la exposición de blancos de unión mediante la remoción de polímeros de envoltura para aumentar la eficiencia de anclado, se reportó una densidad de unión del orden de 10^5 , utilizando el dominio LysM para exhibir proteínas sobre *Lc. lactis* NZ9000 (Bosma et al., 2006) y de 10^6 moléculas exhibidas, nuevamente utilizando el dominio LysM sobre *Lc. lactis* MG1363, *L. bulgaricus* ATCC 11842, *Lcp. plantarum* ST-III, *Lcb. casei*, *Lcb. paracasei*, y *S. thermophilus* (Bosma et al., 2006; Mao et al., 2016). Sin embargo, estas estrategias no tienen en cuenta la viabilidad celular. En este contexto, es importante explorar estrategias más seguras, benignas y fisiológicas que permitan mejorar la capacidad de anclaje preservando al mismo tiempo la viabilidad bacteriana, un requisito esencial para aplicaciones basadas en plataformas probióticas. Es importante considerar que para permitir el anclado del CTSIpA sobre *L. acidophilus*, es necesario previamente depletarlo de su capa S nativa, siendo el LiCl el agente químico de referencia comúnmente usado con este propósito. Esto se debe a la sustitución catiónica mediada por los iones Li^+ . Sin embargo, residuos de LiCl utilizado para la eliminación de la capa S podrían inducir toxicidad cuando las bacterias se administran por vía oral (Sahay et al., 2015). Por esta razón se buscó una estrategia alternativa de decapado que permita mantener las características GRAS de las bacterias utilizadas y preservar la seguridad del sistema. Para ello se utilizó NaCl con el fin de promover la eliminación de la capa S reemplazando el uso de LiCl. Por otro lado, se ha reportado que el crecimiento en condiciones de alta salinidad induce diversas modificaciones en la superficie celular de *Lactobacillus acidophilus*, promoviendo la liberación de proteínas de la capa S de las células (Palomino et al., 2016; Allievi et al., 2019). Considerando estos antecedentes, la estrategia basada en el crecimiento en condiciones de alta salinidad y el uso de NaCl como agente de depleción, se propone como una estrategia viable para favorecer la unión de altos niveles de proteínas heterólogas, manteniendo la seguridad del sistema (Figura 19).

Las cepas probióticas pueden sobrevivir a las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal y colonizar temporalmente ciertos tejidos intestinales. Para el desarrollo de un sistema de exhibición de superficie celular exitoso utilizando la cepa probiótica *L. acidophilus* ATCC 4356,

las características deseables incluyen no sólo la viabilidad de la bacteria sino también asegurar la estabilidad de unión de la proteína exhibida en el ambiente gastrointestinal.

Eslami y colaboradores (2013) reportaron que la proteína de capa S de *L. acidophilus* ATCC 4356 se mantiene estable a pH 3,2 bajo condiciones que simulan estrés gastrointestinal y preserva su integridad en presencia de pepsina y pH ácido (Eslami et al., 2013). En este trabajo, al emplear exclusivamente el dominio C-terminal (CT) de la proteína, también observamos que, a pH 3, la unión de GFP-CTSlpA permaneció estable durante los 60 minutos de incubación. Además, la viabilidad de las células decoradas con este fragmento no se vio afectada, a diferencia de las bacterias sin capa S, lo que sugiere un efecto protector frente a las sales biliares y proteasas que simulan el tránsito gastrointestinal (Figura 20).

El papel de las proteínas de la capa S como portadoras para la exhibición de biomoléculas terapéuticas ha abierto perspectivas interesantes debido a su estatus GRAS, propiedades adyuvantes intrínsecas y efectos inmunomoduladores. Además, se ha reportado actividad antimicrobiana para SlpA de *L. acidophilus*. Particularmente, la región C-terminal de *L. acidophilus* ATCC 4356 presenta actividad de mureína hidrolasa contra la pared celular de la bacteria Gram-negativa *Salmonella enterica* serovar Newport (Prado-Acosta et al., 2010), *E. coli* (Meng et al., 2015) y patógenos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Prado-Acosta et al., 2010). Además, análisis *in silico* y experimentales han revelado que las proteínas de la capa S presentan dos dominios de reconocimiento de carbohidratos localizados en el dominio C-terminal. La capacidad lectina descrita para la SlpA de *L. acidophilus* explicaría el mecanismo para las propiedades inmunomoduladoras, antivirales y antibacterianas informadas para esta proteína (Fina Martin et al., 2019; Martínez et al., 2012).

De acuerdo a las características funcionales de las proteínas SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, se ha demostrado que su dominio CT tienen la capacidad de ser usado como ancla de potenciales enzimas de interés biotecnológico. Los resultados permiten proponer a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 previamente depletado de su capa S nativa como un candidato eficiente para exponer en superficie una alta densidad de proteínas. Por lo tanto, el uso de una cepa probiótica y de grado alimentario como vehículo de entrega de moléculas, representa una estrategia altamente prometedora. Un enfoque novedoso que ha contemplado este estudio radica en la implementación de una estrategia alternativa basada en el uso de NaCl para inducir la liberación de la capa S, lo cual permitió obtener un alto rendimiento de exposición sin comprometer la viabilidad celular ni la seguridad del sistema representando una

opción más segura, inocua y compatible con aplicaciones en biotecnología alimentaria y probiótica.

A la hora de buscar un sistema para exponer proteínas heterólogas sobre la superficie de BAL, es importante poder proponer otras proteínas que puedan ser utilizadas como ancla. En el capítulo 1 se estudió una molécula de anclado que resultó efectiva para la exposición de proteínas heterólogas sobre una especie que presenta capa S, como lo es *L. acidophilus* ATCC 4356. En el capítulo 2 se evaluó el potencial de otra proteína con el propósito de evaluarla en especies sin capa S. En el capítulo 2 de esta tesis, se evaluó la capacidad de anclaje del dominio de unión a pared de la endolisina del fago PL-1. En este estudio, demostramos que la proteína heteróloga GFP-CBD_{Lys} puede unirse eficientemente a la superficie de diversas cepas de BAL que no presentan capa S en su envoltura. La selección de las cepas a la hora de evaluar la aplicabilidad se basó en su estatus GRAS y su relevancia como probióticos o como cultivos iniciadores ampliamente utilizados en fermentaciones alimentarias, lo que las hace especialmente adecuadas para aplicaciones de grado alimentario (Cervantes-García et al., 2021; Jacouton et al., 2017; Y. Liu et al., 2024; Nealon et al., 2017; Seddik et al., 2017). Diversos estudios han reportado, el potencial de cepas de *Lcb. paracasei*, como probióticas. Estos estudios incluyen actividad antimicrobiana y antibiofilm; estimulación del sistema inmunológico; efectos antiinflamatorios, antioxidantes, anti obesidad y antiproliferativos/proapoptóticos; mejora del metabolismo lipídico, efectos hipocolesterolémicos y moduladores del estrés; y la potenciación de la microbiota bacteriana intestinal, entre otros (D. Hill et al., 2018; Jones et al. 2017; Bengoa et al., 2021). Es importante destacar que este conjunto de cepas abarca especies de BAL filogenética y estructuralmente diversas, con diferencias bien documentadas en la arquitectura del peptidoglicano, la composición de los polisacáridos de la pared celular (CWPS), los ácidos lipoteicoicos (LTA) y la presencia o ausencia de proteínas de capa S (Bernard et al., 2011; Chapot-Chartier, 2014; Palomino et al., 2023). Se sabe que estas variaciones estructurales influyen en la afinidad de unión de las endolisinas fágicas y sus dominios CBD derivados. En nuestro espectro de aplicabilidad analizado (Figura 24A–B), se observó una unión más eficiente en *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Latilactobacillus sakei* y *Lactocaseibacillus casei*, siendo *Lcb. paracasei* ATCC 27092 la cepa con mayor especificidad, esto es esperable dado que el CBD proviene de la endolisina del fago PL-1, el cual fue aislado de *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Se puede resaltar, que los resultados provenientes del ensayo de

unión, demuestran una mayor versatilidad del dominio CBDLys, ya que resultó efectivo sobre distintas especies de BAL en cuanto a su capacidad de unión. Para evaluar el rendimiento del sistema de anclaje basado en CBDLys, se cuantificó su capacidad de unión en *Lcb. paracasei* ATCC 27092. La saturación de células con GFP-CBDLys resultó en $7,04 \times 10^6$ moléculas unidas por célula, una capacidad de unión comparable a la de sistemas de exposición en superficie mediados por LysM, SlpA o Cad4a (Hu et al., 2010; Gordillo et al., 2020; Tay et al., 2020).

Como se ha mencionado, el dominio CBD proviene de la endolisina del fago PL-1. Las endolisinas son proteínas que junto con las holinas, generan poros en la envoltura bacteriana y degradan el PG, permitiendo la liberación de la nueva progenie. Estos poros se generan desde el interior bacteriano (Figura 10). Debido a que el objetivo de este trabajo, es poder exponer una alta densidad de péptidos en BAL de grado alimentario, es importante evaluar la tolerancia gastrointestinal de las células decoradas. Los ensayos de estrés gastrointestinal *in vitro* demostraron que determinadas situaciones disminuyen la unión. Las condiciones que resultaron más perjudiciales fueron a un pH menor a 4. Se ha informado, que en cepas como *Lcb. paracasei* el pH interno se mantiene alrededor de 6 (Wu et al., 2021), debido a que el pH ácido no es el entorno en el que son funcionales las endolisinas, se puede anticipar que esta condición afecte la tolerancia de la proteína a este tipo de estrés. Otras condiciones que resultaron nocivas fueron el tratamiento con pepsina a concentraciones mayores a 0,3% y todas las condiciones de pancreatina evaluadas (Figura 25).

La pancreatina utilizada en los ensayos contiene lipasas, amilasas y proteasas. La reducción en la unión después del tratamiento con pancreatina sugiere degradación proteolítica del CBD. Los resultados de la figura 26 demuestran que la estabilidad del CBDLys se ve afectada tanto en su forma libre, como cuando se une al PG. Teniendo en cuenta estos resultados, sería conveniente a futuro evaluar estrategias de protección en el tracto gastrointestinal, como puede ser encapsulación celular, de modo tal de poder preservar la funcionalidad del CBDLys como dominio *carrier* de la proteína de interés.. Diversos estudios han demostrado encapsular con éxito cepas de *Lcb. paracasei* ATCC 27092, utilizando alginato como matriz de encapsulación, en los cuales se observó un aumento en el porcentaje de supervivencia, respecto a las células libres (Gómez-Aldapa et al., 2023; Soares et al., 2020). Sin embargo, es importante contrastar que en las condiciones de estrés evaluadas, no hay diferencias significativas en la viabilidad de los microorganismos en condición control, respecto a la decorada con la proteína quimera. Por lo tanto, la unión no afecta la viabilidad.

Cabe destacar que el CTSIpA presentó mayor tolerancia a las condiciones de estrés GI, sin embargo, el CBDLys presentó la capacidad de unirse a la envoltura de más cepas de BAL, es por eso que a la hora de seleccionar una un dominio como ancla, es importante tener en cuenta estos factores y cuál es el fin de la unión.

Los dominios CBD dirigen las endolisinas fágicas hacia su blanco mediante el reconocimiento específico de ligandos asociados a la pared celular, incluidos el peptidoglicano (PG), los polímeros secundarios como los ácidos lipoteicoicos (LTA) o los polisacáridos de la pared celular (CWPS), y en algunos casos, proteínas asociadas a la pared celular, con notable especificidad molecular (MJ Loessner 2005). Para dilucidar el blanco de unión de CBDLys, sometimos células de *Lcb. paracasei* ATCC 27092 a una serie de tratamientos químicos diseñados para eliminar selectivamente componentes individuales de la envoltura celular. El tratamiento con ácido tricloroacético (TCA), conocido por eliminar eficazmente polímeros secundarios como los ácidos teicoicos y CWPS, condujo a un aumento marcado en la unión de CBDLys. En cambio, el tratamiento con SDS, que remueve principalmente proteínas asociadas a la pared celular, no tuvo un efecto significativo. Notablemente, el tratamiento con mutanolisina, una enzima que degrada la cadena glucídica del PG, resultó en una disminución significativa en la unión de CBDLys. En conjunto, estos resultados respaldan la conclusión de que el PG es el principal sustrato de unión de CBDLys. Además, la eliminación de polímeros secundarios como LTA y CWPS podría estar desenmascarando motivos adicionales del PG, aumentando el número de sitios accesibles de unión y, por tanto, mejorando la capacidad de anclaje de CBDLys.

Como se ha mencionado anteriormente, entre las estrategias de anclaje no covalente, los tratamientos químicos como el TCA se han utilizado ampliamente para mejorar la unión superficial de proteínas ancla, estas plataformas pueden encontrarse bajo el nombre de BLP o como Matriz potenciadora de Gram positivas (GEM) (Bosma et al., 2006; Mao, Zhou, et al., 2016; Niu et al., 2024; Steen et al., 2003). Aunque estos métodos potencian la capacidad de exhibir péptidos en superficie, a menudo comprometen la viabilidad celular. Además, implican protocolos que pueden ser inadecuados para aplicaciones alimentarias o probióticas debido a su citotoxicidad. Como era de esperarse, el tratamiento con TCA a 100 °C resultó en el mayor aumento en la capacidad de unión, pero eliminó por completo la viabilidad bacteriana. Al modificar el protocolo de TCA a 37 °C se obtuvo un incremento limitado (0,5 veces) en la unión, pero con una reducción de cinco órdenes de magnitud en el recuento de viables (Figura 28B-C).

Aunque efectivos para mejorar la exposición, estos tratamientos contradicen la principal ventaja del uso de bacterias vivas como plataformas de entrega, un aspecto clave en aplicaciones basadas en probióticos.

Para superar estas limitaciones, en el capítulo 3 de este trabajo, se exploró una alternativa más segura y fisiológicamente compatible que permitiera aumentar la eficiencia de anclaje sin afectar la viabilidad celular. A partir de estudios previos se sabía que un crecimiento en estrés osmótico podía inducir cambios en la envoltura en cepas como *Lcb. casei* en lo que concierne a contenido y composición de LTA y peptidoglicano (Palomino et al., 2013, 2016; Piuri et al., 2003, 2005). Por ello, se evaluó el comportamiento de *Lcb. paracasei* frente a este tipo de estrés, estudiando los cambios que suceden a nivel de envoltura y cómo afecta estos cambios en la capacidad de unión de la proteína ancla. En contraste a los resultados obtenidos con TCA 10% a 37 °C, el crecimiento en MRS 0,75 M NaCl aumentó significativamente la unión de CBDLys —aproximadamente 3 veces— sin comprometer la viabilidad celular. Esta estrategia también se aplicó con éxito a otras especies de LAB en este estudio, destacando su robustez y aplicabilidad como estrategia no tóxica para mejorar la exposición superficial (Figura 29).

Por otro lado, los estudios de morfología a partir del análisis por microscopía, indicaron diferencias significativas en la relación de aspecto, lo que lleva a la pérdida típica de bacilo adoptando una forma circular en condiciones de estrés. Los cambios morfológicos en bacterias que alteran la forma celular están asociados con los mecanismos adaptativos de supervivencia bacteriana (Pianetti et al., 2009). Esto también fue observado por Piuri et al. 2005, donde revela que los cambios morfológicos en *Lcb. casei* bajo estrés osmótico, como el aumento del tamaño celular y alteraciones en la pared, son estrategias adaptativas clave para mantener la supervivencia bacteriana. Por medio de HPLC observaron una disminución de enlaces cruzados entre muropeptidos, lo cual se asocia a una mayor flexibilidad de la pared, permitiendo la expansión celular para compensar la presión osmótica. A su vez, la pared menos rígida facilita la regulación del volumen celular ante cambios osmóticos y evita la lisis por presión osmótica interna (Piuri et al., 2005). En *Lcb. paracasei* ATCC 27092, se observaron adaptaciones de este tipo, a partir de cambios morfológicos, sin embargo se descartó que estos cambios influyan en el aumento de la unión de la proteína ancla, debido a que no hay diferencias significativas en el área de las células de la situación control y en estrés osmótico. Este resultado llevó a proponer que el aumento en la intensidad, atribuido a un mayor anclaje de la proteína en estudio, se debe a modificaciones en la envoltura celular inducidas por el

estrés osmótico. Por lo tanto se analizaron los cambios estructurales de la envoltura celular de *Lcb. paracasei* ATCC 27092. Los estudios bioquímicos demostraron una mayor afinidad de la proteína ancla hacia el PG extraído de microorganismos cultivados bajo estrés osmótico y hacia el PG desacetilado químicamente. Esto no sólo confirma el PG como blanco de la proteína ancla, sino que apoya que las modificaciones que ocurren en la envoltura celular a partir del crecimiento en NaCl favorecen la unión a éste. Los resultados del dot blot permiten inferir que el crecimiento en estrés salino ocasiona cambios a nivel de las O-acetilaciones del PG. Esto fue confirmado mediante la cuantificación de grupos acetilos, utilizando una versión modificada del método de Hestrin. Nuestros resultados revelaron una reducción significativa de los polímeros secundarios de la pared, incluidos LTA y CWPS, en células cultivadas en condiciones de alta salinidad. Esto se corroboró con el análisis cuantitativo del contenido de ramnosa en fracciones de pared celular, el cual mostró una disminución significativa en las células tratadas con NaCl frente al control, lo que indica una reducción en las estructuras CWPS ricas en ramnosa.. Finalmente, estas evidencias bioquímicas fueron respaldada por el análisis de expresión génica, que mostraron una regulación negativa de *ltaS*, *oafA* y *wcaA*, genes involucrados en la biosíntesis de LTA, la O-acetilación del PG y la glicosilación de CWPS, respectivamente (Tabla 5 y Figura 31). Los estudios de *docking* respaldan los hallazgos experimentales sobre el impacto de la desacetilación del PG en la afinidad de unión de CBDLys. En particular, las simulaciones revelaron que la forma desacetilada del PG exhibió la mayor especificidad por CBDLys, en concordancia con nuestros datos experimentales que muestran una mayor unión en células de *Lcb. paracasei* adaptadas a alta salinidad. Además, el estudio de *docking* molecular identificó regiones de unión ("hot spots") distintas según los estados de acetilación del PG, lo que refuerza la hipótesis de que las modificaciones estructurales del PG influyen directamente en la dinámica de interacción del dominio de anclaje CBDLys. No obstante, si bien nuestras simulaciones apoyan el mecanismo propuesto, serían necesarios estudios estructurales adicionales (como RMN o cristalografía) para caracterizar completamente las interacciones moleculares entre CBDLys y el PG modificado bajo condiciones de estrés osmótico.

Estudios previos han reportado modificaciones en la superficie celular de *Lactobacillus casei* durante la adaptación al estrés osmótico. Estas incluyen una disminución en el entrecruzamiento del PG y una mayor sensibilidad a enzimas hidrolíticas de la pared celular, posiblemente debido a una reducción en la O-acetilación del PG (Piuri et al., 2005;

Chapot-Chartier, 2014). En un contexto similar, se ha informado que la exposición de *Lactocaseibacillus casei* BL23 a altas concentraciones de sal provoca alteraciones sustanciales en la composición de la pared celular, incluyendo una disminución en la producción de LTA, acortamiento de las cadenas de LTA y reducción en la sustitución con D-alanina (Palomino et al., 2013). En conjunto, los cambios en la envoltura que sufre *Lcb. paracasei* ATCC 27092 proporcionarían una matriz de PG más accesible, aumentando así la eficiencia de los sistemas de anclaje aquí propuestos.

Además, las modificaciones en la composición de CWPS bajo condiciones de estrés salino pueden influir en la susceptibilidad de las BAL a infecciones fágicas. Varias especies de *Lactocaseibacillus* producen CWPS enriquecidos en residuos de ramnosa, que actúan como ligandos clave para el reconocimiento y la adsorción fágica (Dieterle, Jacobs-Sera, et al., 2014; Garcia-Vello et al., 2020; Guérin et al., 2022; Vinogradov et al., 2016). En particular, se ha identificado ramnosa en la pared celular de *Lcb. paracasei* (Dieterle et al., 2014), lo que la hace especialmente relevante en el contexto de las interacciones fago-hospedador, un aspecto crítico en la industria láctea, donde las infecciones fágicas pueden interrumpir procesos fermentativos. En este trabajo hemos demostrado que el crecimiento de *Lcb. paracasei* bajo condiciones de alta salinidad reducen la adsorción del fago, incluso cuando las células están decoradas con la proteína ancla (Figura 35). Esta menor susceptibilidad estaría vinculada a la regulación negativa observada de *wcaA*, un gen que codifica una putativa glicosiltransferasa de CWPS, y se ve respaldada por nuestro análisis cuantitativo que muestra niveles reducidos de ramnosa en la pared celular bajo estrés salino (Figura 31). En conjunto, estos hallazgos proporcionan una conexión directa entre el estrés osmótico, la reducción en la producción de CWPS y la disminución en la adsorción del fago PL-1.

En conclusión, en conjunto, las investigaciones plasmadas en los capítulos 2 y 3, demuestran que el dominio CBDLys de la endolisina del fago PL-1 representa un módulo de anclaje novedoso y eficaz para la exposición superficial no covalente de proteínas funcionales en cepas de BAL no modificadas genéticamente con propiedades probióticas. Esto resulta especialmente relevante en aplicaciones donde es esencial preservar el estatus GRAS, como las plataformas de entrega de grado alimentario o las terapias bacterianas vivas. Un aspecto clave de este estudio es la estrategia de crecimiento en alta salinidad, que no solo preserva la viabilidad de las BAL, sino que también mejora significativamente su desempeño como

sistemas de exhibición biológicos, ofreciendo una plataforma segura y potencialmente escalable para la exposición de proteínas recombinantes.

El proceso de autorización para la liberación experimental y comercial de OGM en Argentina requiere un exhaustivo protocolo de evaluación. Muchas veces, este proceso involucra a varias entidades. Por ejemplo, la Dirección de Biotecnología y la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) evalúan los riesgos para los agroecosistemas, mientras que la Coordinación General de Biotecnología del SENASA junto a su Comité Técnico Asesor para el Uso de OGM (CTAUOGM), se encargan de la seguridad alimentaria humana y animal. Para obtener la autorización comercial, el OGM debe demostrar equivalencia en seguridad y valor nutricional con su contraparte no transgénica, sin introducir nuevos alérgenos, toxinas o antinutrientes (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, 2021). Ante estos desafíos regulatorios, la estrategia basada en CTSIpA y CBDLys garantiza que los microorganismos conserven su funcionalidad, maximizando así su potencial terapéutico. Las proteínas de interés se producen en un sistema de expresión externo y, mediante ensayos de unión, se incorporan a la envoltura bacteriana. De este modo, se preserva la seguridad y eficacia de los sistemas de liberación basados en probióticos, lo que favorece no sólo la aceptación del consumidor al emplear organismos no modificados genéticamente (no-GMO) con perfiles de seguridad ya establecidos, sino también permite eludir las complejidades del proceso regulatorio, facilitando así su implementación en contextos terapéuticos o alimentarios.

Una vez obtenidas las células viables decoradas, el siguiente paso consiste en definir la formulación adecuada para su administración. Para maximizar la sinergia entre los beneficios de las proteínas de interés y las propiedades probióticas de los microorganismos, es fundamental garantizar la viabilidad del microorganismo en el sitio de acción. Esto requiere, en primer lugar, asegurar su estabilidad y supervivencia a lo largo de los procesos de producción y almacenamiento. Es por eso que la evaluación de la viabilidad según el método de almacenamiento, es un factor importante al momento de trabajar con probióticos, debido a que mantener la viabilidad es un requisito para considerar a una cepa probiótica, ya que por definición, estos son microorganismos vivos, lo cuales en cantidades adecuadas ejercer una acción benéfica sobre la salud del hospedador (Hill *et al.* 2010). En el presente trabajo de tesis, se han observado distintas tendencias según el tipo de crecimiento al cual son sometidos los lactobacilos (véase Tabla 9). En base a los resultados obtenidos se puede decir que cuando las

bacterias son crecidas en condiciones MRS estándar, la mejor forma de almacenar estos probióticos durante un periodo de 28 días, resultó ser la liofilización. En cuanto al almacenamiento a 4 °C, los resultados invitan a pensar que la proteína ancla podría estar brindando una especie de protección ante las condiciones de estrés que puede generar el almacenamiento en frío. Al evaluar la preservación de la viabilidad cuando las bacterias provienen de un crecimiento en alta salinidad, se obtiene una tendencia diferente a la obtenida en la condición control. En primer lugar, la condición que resultó ser más benéfica para su preservación en este periodo de tiempo, resultó ser a 4 °C sin decorar con la proteína quimera junto a la preservación post-liofilización en ambas condiciones de crecimiento. La robustez en cepas de *Lcb. paracasei* para tolerar el proceso de liofilización ha sido demostrado en diferentes estudios, donde se ha destacado su supervivencia al proceso de liofilización en un periodo de un mes, incluso a mayor tiempo (Peralta et al., 2019; Jalali et al., 2012; Peralta et al., 2017; Zárate et al., 2006). Por otro lado, en cuanto a la tolerancia al frío, hemos observado pérdidas de la viabilidad en el almacenamiento a 4 °C (Tabla 9). Por lo tanto, sería pertinente analizar si el uso de crioprotectores puede revertir esta tendencia y mejorar la estabilidad celular durante el almacenamiento en frío. Sin embargo, a corto plazo, 28 días de estudio, se resalta la tolerancia de *Lcb. paracasei* a los procesos de almacenamiento. En cuanto a la retención de la unión se obtuvo que cuando los microorganismos son pre crecidos en condiciones estándar, la unión se mantiene sin diferencias significativas durante el periodo de estudio independiente del tipo de crecimiento, en cambio, al ser crecidas en condiciones de estrés se observó que esta tendencia solo se mantiene para la condición de almacenamiento posterior a la liofilización. Estos resultados sugieren que la elección de una estrategia óptima de almacenamiento debe estar guiada por el objetivo específico de conservación y administración del probiótico. que a la hora de seleccionar una estrategia de almacenamiento óptima, va a depender del objetivo por el cual se necesite conservar y administrar el probiótico, No será lo mismo si se necesita mantener stocks viables a largo plazo o si el objetivo sólo requiere disponer de cultivo activo por en días–semanas. Esto resalta la importancia de seleccionar implica la necesidad de seleccionar el método más adecuado según el uso previsto para cada caso.

En la presente tesis, no se ha evaluado la supervivencia y conservación de *L. acidophilus*, estos estudios se están realizando actualmente en el laboratorio. Los resultados parciales han sido publicados en la tesina de la Lic. Jastrebow (Jastrebow 2024), de la cual he sido directora adjunta, y cuyo trabajo se llevó a cabo en el mismo laboratorio donde se desarrolló la presente

tesis. Se ha observado una baja tolerancia tanto al proceso de liofilización como a la retención de la proteína ancla, siendo esencial tratar estos microorganismos con lio- y crioprotectores, previo a su almacenamiento (Ortakci & Sert, 2012).

Como se mencionó en la introducción, los lactobacilos son habitantes importantes de la microflora normal del tracto gastrointestinal, y algunas especies seleccionadas se han utilizado ampliamente como cultivos probióticos. Una propiedad potencialmente importante de estos organismos es su capacidad para interactuar con células epiteliales en el tracto intestinal, lo que puede promover la retención y la comunicación entre el huésped y las bacterias. En este contexto, se evaluó la capacidad de adhesión a mucinas, principal componente del moco intestinal, como un modelo *in vitro* que permite estimar el potencial de interacción de las bacterias con la mucosa y predecir su capacidad de colonización y permanencia en el entorno gastrointestinal. En este sentido, resultó relevante analizar si las modificaciones inducidas por la decoración con proteínas heterólogas y el crecimiento bajo condiciones de estrés osmótico afectan la capacidad de adhesión de las células. Los resultados arrojaron distintas tendencias según la condición de crecimiento del microorganismo. En *Lcb. paracasei* 27092 se observó una capacidad similar de adhesión tanto en su condición control como decoradas con la proteína ancla. Este resultado es alentador, ya que la adhesión a mucinas es una propiedad funcional deseable en probióticos por su potencial beneficio en la interacción con el hospedador (Monteagudo-Mera et al., 2019). Además, es relevante destacar que la capacidad de adhesión no se vio afectada por la decoración con la proteína ancla, lo que sugiere que, en el futuro, podría ser viable fusionar nuestra proteína ancla con otras proteínas funcionales de interés terapéutico, sin que se altere esta capacidad de unión. Por otro lado, el crecimiento bajo estrés osmótico produjo una disminución significativa en la adhesión, tanto en células decoradas como no decoradas con respecto a células control. Como se ha mencionado en el capítulo 3, el pre crecimiento en estrés osmótico, ocasiona cambios a nivel de la envoltura, donde se ven afectados los polímeros secundarios que la integran. La capacidad de adhesión de las bacterias depende tanto de componentes proteicos, como las proteínas de membrana (adhesinas), las cuales median la unión a la capa de moco intestinal. También depende de componentes no proteicos, como los LTAs. Además, la exposición a estrés ambiental o cualquier cambio en la superficie de la membrana bacteriana puede alterar su adhesión a las células intestinales (Buck et al., 2005). En un estudio realizado en el 2016, se evaluó cómo afecta el estrés salino la capacidad de adhesión a células Caco-2 en cepas de *L. acidophilus*,

Lcb. casei y *Bifidobacterium bifidum*, donde se observó una reducción significativa en la capacidad de adhesión de las bacterias cuando se cultivaron en medios suplementados con NaCl. La menor adhesión se observó con 10.0% de NaCl. Las bacterias responden al estrés ambiental alterando la naturaleza de la pared celular o acumulando solutos compatibles dentro de la célula. Otro estudio, realizado en cepas de *L. acidophilus*, *Lcb. casei* y *Bifidobacterium bifidum*, reveló cómo la alta concentración de los niveles de sal en el medio de cultivo, pueden ocasionar cambios en la envoltura bacteriana y los efectos de estos cambios se observaron en la capacidad de adhesión. La capacidad de adhesión de las bacterias estresadas se redujo a altas concentraciones de sal (Gandhi & Shah, 2016). Estos resultados proporcionan información sobre cómo el efecto causado por NaCl puede alterar la capacidad de adherencia en BAL. Respecto a *L. acidophilus* 4356, al comparar las propiedades de adhesión entre tres tipos celulares: microorganismos con su capa S nativa, microorganismos sin capa S y microorganismos decorados con la proteína GFP-CTSlpA, se observó adhesión sólo en las células que conservan su capa S nativa. No se observó adhesión en los otros tipos celulares, ya sean en células depletadas de su capa S nativa como en células decoradas pretratadas con LiCl. Diversos estudios han identificado en cepas de *L. acidophilus* la presencia de factores de superficie relevantes para la adhesión, incluyendo proteínas con motivos LPxTG, dominios MucBP, pilis tipo SpaCBA y SpaFED, así como la proteína de capa S SlpA (Mercier-Bonin & Chapot-Chartier, 2017). En particular, Buck et al. (2005) demostraron en la cepa *L. acidophilus* NCFM que la proteína SlpA, junto con proteínas de unión a fibronectina y mucinas, contribuye significativamente a la capacidad de adhesión a células intestinales tipo Caco-2 *in vitro*. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis para la cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, los mismos sugieren, que la proteína de capa S constituye un determinante principal en la adhesión de esta cepa al mucus intestinal. Teniendo en cuenta que la bibliografía indica la participación de múltiples componentes de superficie en la adhesión de *L. acidophilus* a la mucosa, es posible que el tratamiento con LiCl afecte no solo la capa S, sino también otras estructuras involucradas en la interacción con el hospedador. Para evaluar esta hipótesis, se propone en estudios futuros analizar el impacto del LiCl sobre otros componentes de la envoltura celular, así como realizar ensayos de adhesión utilizando estrategias alternativas de remoción de la capa S, como el uso de NaCl, con el fin de preservar mejor la integridad funcional de la superficie bacteriana.

La elección de β -galactosidasa como proteína funcional para su exposición en la superficie de

bacterias ácido lácticas representa un paso estratégico hacia la aplicación biotecnológica del sistema de anclaje desarrollado. Esta enzima no solo posee un reconocido valor industrial para la hidrólisis de lactosa y la síntesis de GOS, sino que además responde a una necesidad fisiológica concreta, como es la intolerancia a la lactosa, que afecta a una gran parte de la población mundial. La exhibición superficial de β -galactosidasa en BAL permitiría generar formulaciones probióticas capaces de liberar localmente la enzima activa en el tracto gastrointestinal, favoreciendo la digestión de la lactosa sin alterar las propiedades organolépticas de los alimentos, como ocurre en los productos deslactosados convencionales. La unión de β -galactosidasa a los dos dominios *carriers*, se realizó de manera exitosa. Según los resultados se observó que la proteína conserva e incluso aumenta su actividad cuando se encuentra fusionada a ambos dominios, respecto a cuando está libre. Esto invita a pensar que los dominios CTSIpA y CBDLys, pueden favorecer conformaciones catalíticas óptimas, mejorando la interacción de la enzima con el sustrato.

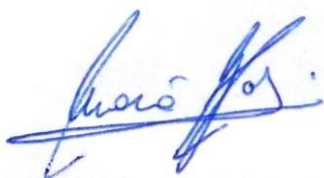
En cuanto a los resultados de unión, se emplearon dos métodos de detección basados en inmunofluorescencia indirecta. La IFI puede ser eficiente para detectar la marcación de nuestra enzima sobre las BAL utilizadas (Figura 40), sin embargo, el éxito de esta técnica depende de varios factores. Por un lado, el poder adherir BAL a vidrios, luego requiere varios controles estrictos, la calidad de los anticuerpos, la concentración de los anticuerpos utilizados, contar con un equipo para poder visualizar el fluoróforo utilizado. Esos elementos representan un desafío clave para garantizar una óptima detección. Si bien se intentó utilizar citometría de flujo, esta técnica, aunque permite trabajar con células en suspensión, presenta ciertas limitaciones. Entre ellas, el elevado costo asociado al uso de anticuerpos y la complejidad operativa del ensayo, lo que la convierte en una metodología desafiante para su aplicación rutinaria. Por ello, como alternativa a la microscopía de fluorescencia, se propone la implementación de un ensayo basado en el 'decapado' de la proteína anclada, seguido de su análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta estrategia permitiría validar la unión y cuantificarla sin recurrir inicialmente a técnicas más costosas o complejas.

Finalmente, los resultados en conjuntos, permiten proponer a los dominios CTSIpA de *L. acidophilus* ATCC 4356 y al dominio CBDLys proveniente de la endolisina del fago PL-1, como anclajes eficientes para la exhibición de proteínas en la superficie de *L. acidophilus* ATCC 4356 y *Lcb. paracasei* ATCC 27092 respectivamente. La combinación de estos sistemas con

estrategias alternativas de decapado y estrategias de crecimiento bajo estrés osmótico que emplean NaCl ofrece una vía más segura para funcionalizar la superficie de BAL, sin necesidad de modificarlas genéticamente, facilitando su potencial aplicación. Esta estrategia no solo preserva el estatus GRAS y las propiedades probióticas de las cepas utilizadas, sino que también facilita su aceptación regulatoria y por parte del consumidor. Además, la posibilidad de inmovilizar proteínas funcionales, péptidos bioactivos o epítopes inmunogénicos en superficie, amplía considerablemente las aplicaciones potenciales, abarcando desde el desarrollo de plataformas vacunales orales hasta alimentos funcionales con propiedades terapéuticas dirigidas (*biodelivery*). En conjunto, este sistema representa una estrategia biotecnológica versátil y prometedora frente a desafíos actuales en salud y nutrición.



Lic. Tania Belén Gordillo
Firma del doctorando/a



Dra. María Mercedes Palomino
Firma del director/a

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material Suplementario: Capítulo 1

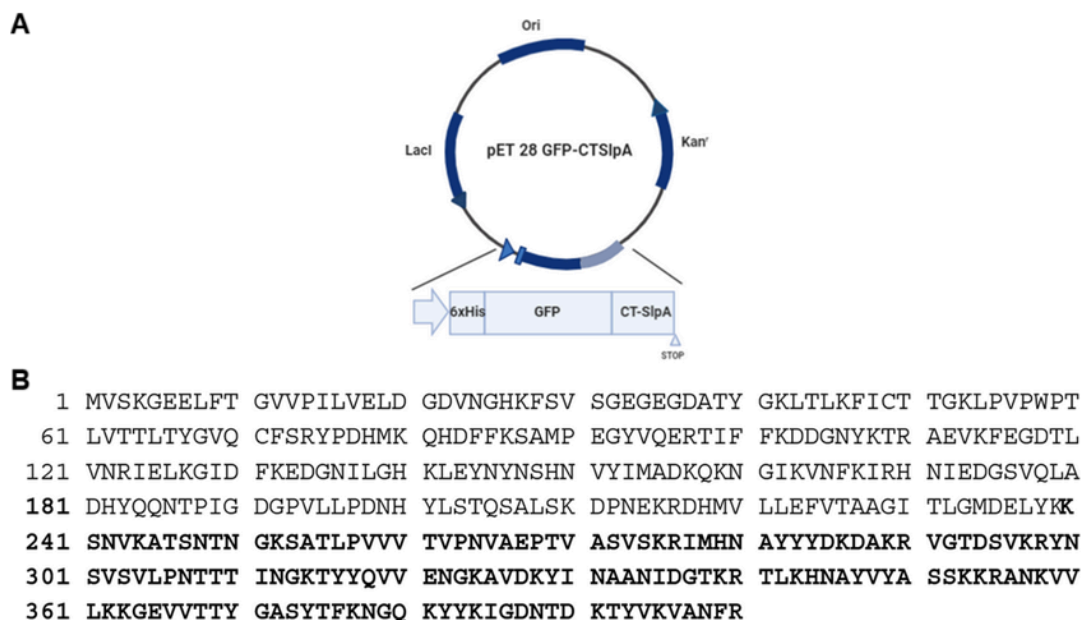


Figura MS1. Construcción de la proteína GFP-CTSlpA **(A)** Esquema del vector pET28bGFP-CTSlpA. **(B)** Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica GFP-CTSlpA, con la secuencia correspondiente a la proteína GFP, seguida de la secuencia del dominio CT de la proteína SlpA, resaltada en negra.

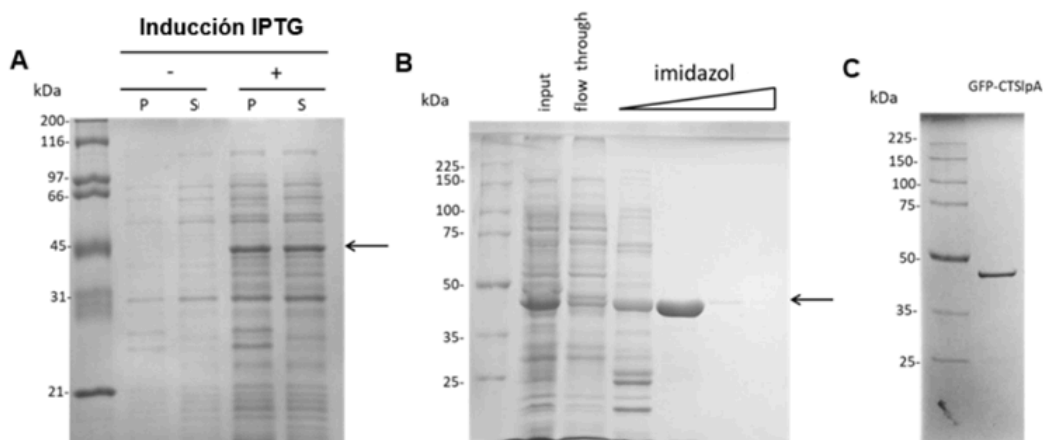


Figura MS2. Análisis por SDS-PAGE de la expresión **(A)** y purificación **(B)** de la proteína de fusión GFP-CTSlpA. La flecha marca la proteína recombinante (45 kDa). La imagen **(C)** corresponde a la proteína purificada. P= Precipitado, fracción insoluble. S= Fracción soluble.

Material Suplementario: Capítulo 2

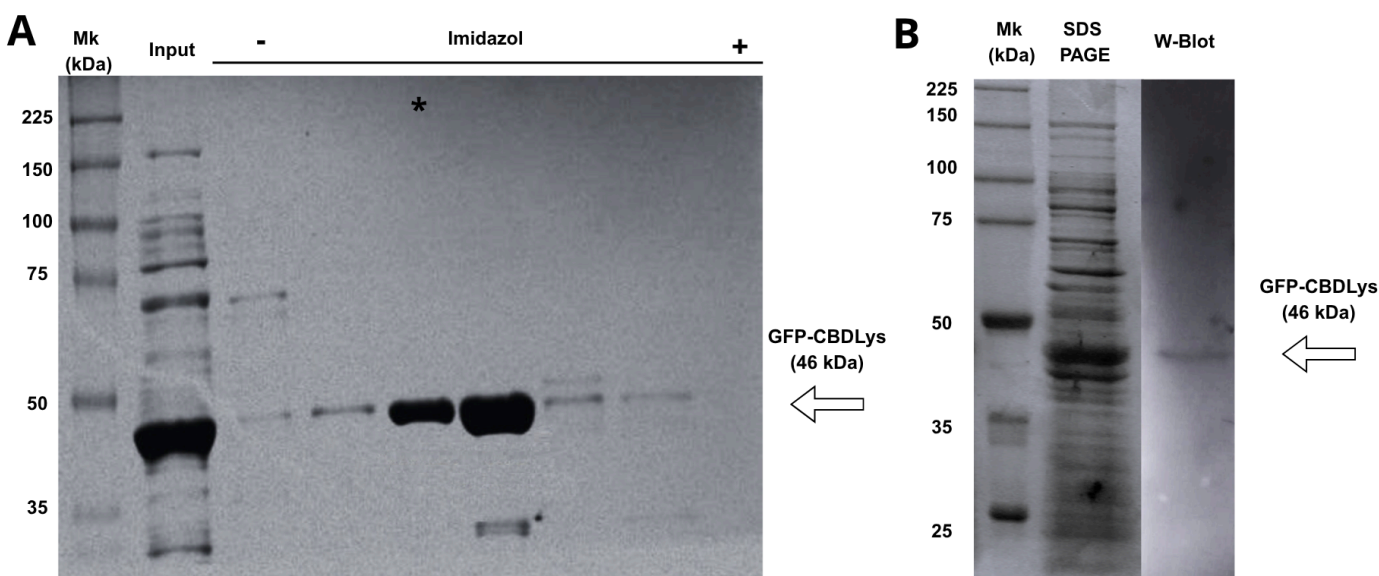


Figura MS3. Purificación y caracterización GFP-CBDLys. **(A)** Se muestra por SDS-PAGE el perfil de purificación de la proteína de fusión GFP-CBDLys (46 kDa, señalada por la flecha). 'Input' corresponde al lisado total antes de la purificación. Los carriles bajo la etiqueta 'Imidazol' corresponden a eluciones escalonadas con concentraciones crecientes de imidazol. La proteína de fusión se eluyó principalmente a 100 mM de imidazol, como se indica con el asterisco (*). **(B)** Caracterización por SDS-PAGE y Western blot de la proteína de fusión GFP-CBDLys. El lisado proteico total de *E. coli* que expresa GFP-CBDLys se separó en un gel de SDS-PAGE al 10% (carril central). El Western blot (panel derecho) confirmó la presencia e integridad de la proteína de fusión al detectar una banda del tamaño esperado (46 kDa), correspondiente a la GFP-CBDLys marcada con His (flecha).

Material Suplementario: Capítulo 3

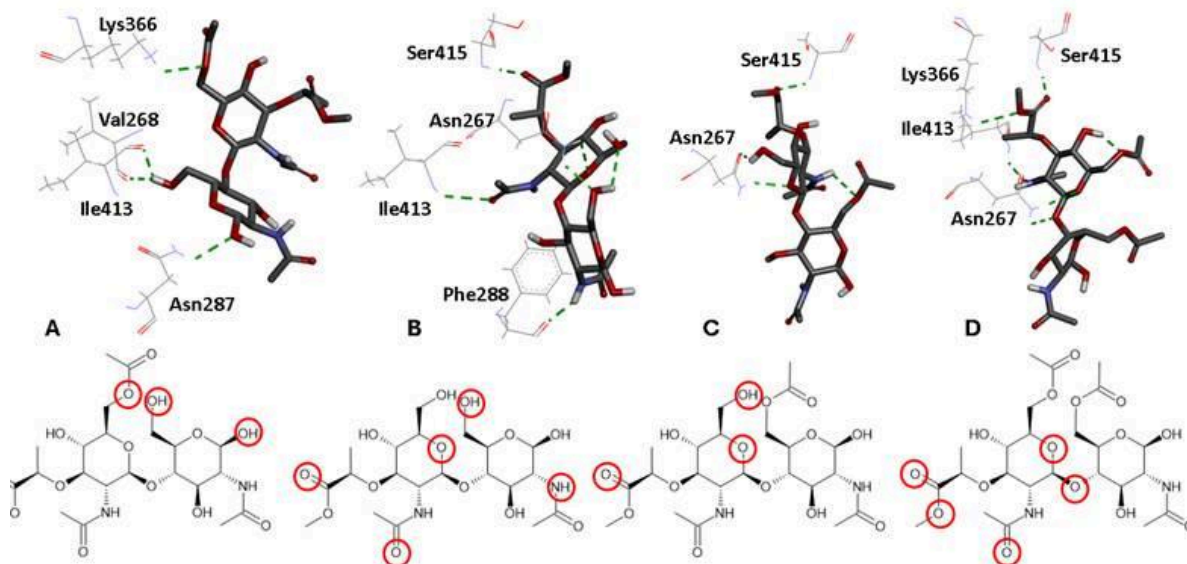


Figura MS4. Interacciones por puentes de hidrógeno de poses representativas en la región A. **(A)** Ligando 1, **(B)** Ligando 2, **(C)** Ligando 3 y **(D)** Ligando 4. Ligando 1 muestra interacciones por puentes de hidrógeno con Val268, Asn287 e Ile413 (porción NAG), mientras que la porción acetilada de NAM interactúa con Lys366 (grupo C6-acetilado). Ligando 2 interactúa mediante puentes de hidrógeno con los grupos C6-OH y el grupo acetamida en C3 de la porción NAG (Asn267 y Phe288, respectivamente), así como con los grupos lactato y acetamida de NAM (Ser415 e Ile413, respectivamente). Ligando 3 y Ligando 4 muestran interacciones por puentes de hidrógeno en la porción NAM, involucrando a los residuos Asn267, Lys366 y Ser415.

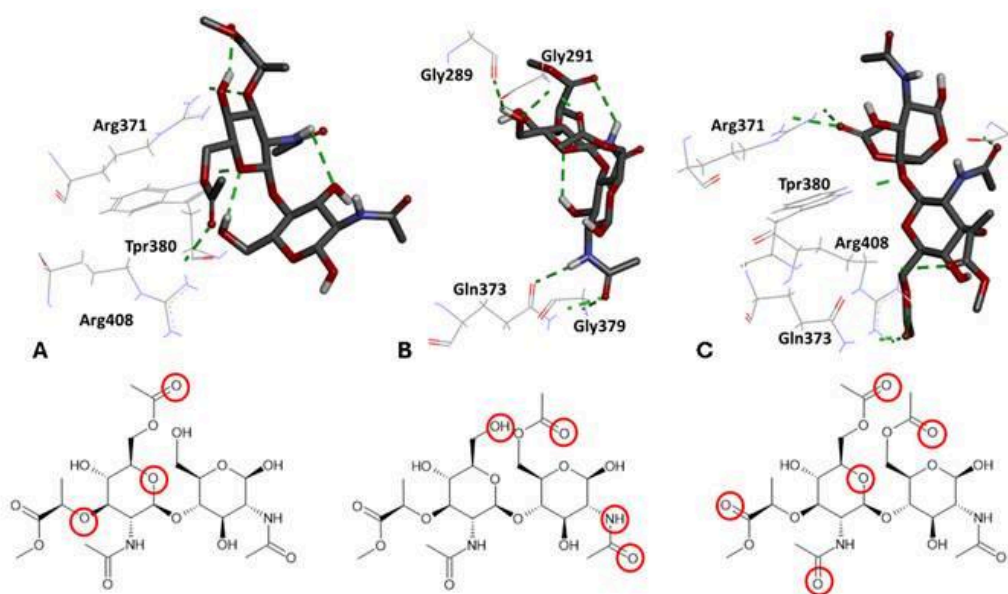


Figura MS5. Interacciones por puentes de hidrógeno de poses representativas en la región B. **(A)** Ligando 1, **(B)** Ligando 3 y **(C)** Ligando 4. Ligandos 1 y 3 forman interacciones principalmente con la región acetilada. Ligando 1 interactúa con Arg371, Trp380 y Arg408 en la porción NAM, mientras que Ligando 3 forma interacciones entre Gly289 y Gly291 con el C6-OH y O-pirano de NAG y entre Gly289 y Arg371 con el C6-OH y el grupo lactato de NAM, respectivamente. Ligando 4 muestra interacciones de la porción NAG (C6-acetilado) con el residuo Arg371, mientras que la porción NAM interactúa con Gln373, Trp380 y Arg408 (grupo lactato, C6-acetilado y O-pirano, respectivamente).

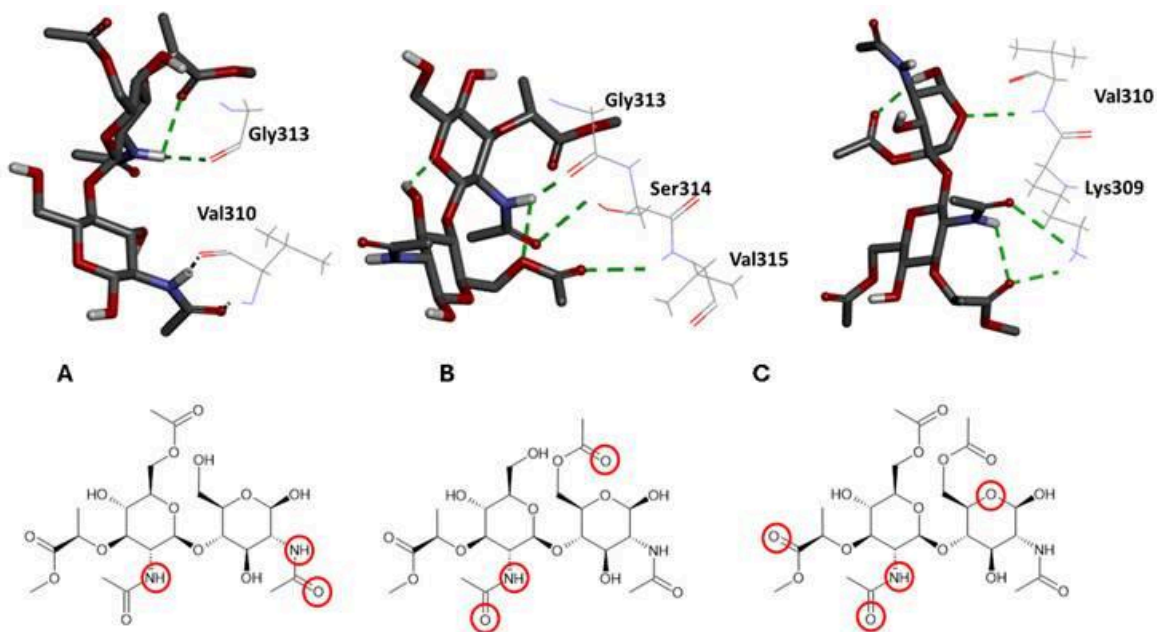


Figura MS6. Interacciones por puentes de hidrógeno de poses representativas en la región C. **(A)** Ligando 1, **(B)** Ligando 3 y **(C)** Ligando 4. Ligando 1 muestra interacciones de NAM y NAG con los residuos Gly313 y Val310, respectivamente. Para Ligando 3, el grupo acetamida de NAM interactúa con Gly313 y Ser314, mientras que el grupo C6-acetilado de NAG interactúa con Val315. Ligando 4 muestra interacciones de la porción NAM con Lys309, y el O-pirano del grupo NAG interactúa con Val310.

Material Suplementario: Capítulo 4

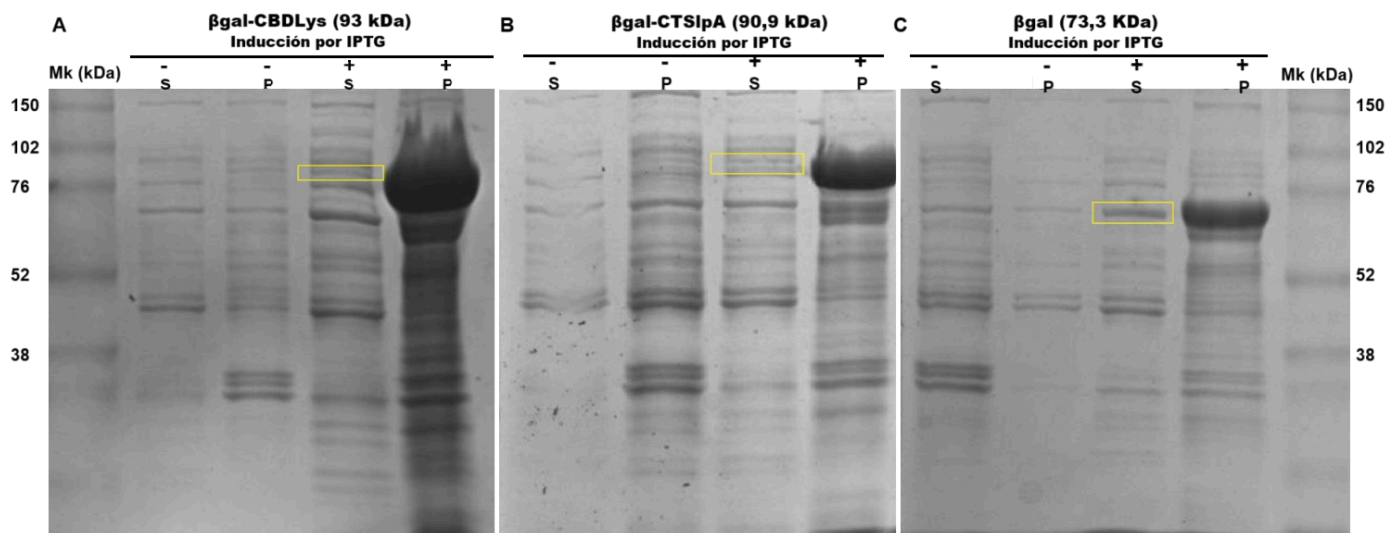


Figura MS7. Caracterización de las proteínas quimeras fusionadas con β -galactosidasa por SDS-PAGE. **(A)** SDS-PAGE 10% para la proteína β gal-CBDLys, comparando las fracciones inducidas y no, con IPTG. **(B)** SDS-PAGE 10% para la proteína β gal-CTSlpA, comparando las fracciones inducidas y no, con IPTG. **(C)** SDS-PAGE 10% para la proteína β gal, comparando las fracciones inducidas y no, con IPTG. Las proteínas de interés se encuentran señaladas. Mk= Marker de proteínas. P= Precipitado, fracción insoluble. S= Fracción soluble.

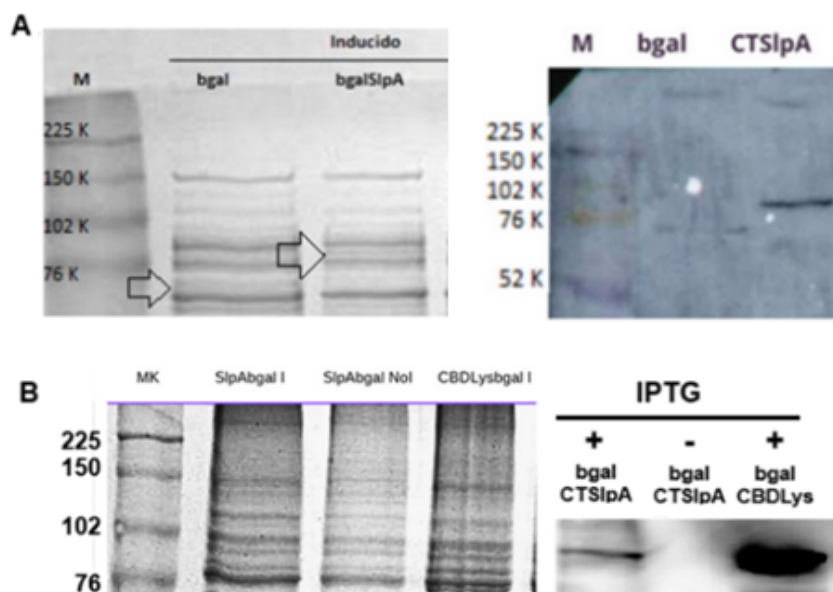


Figura MS8. Western blot de las proteínas en estudio. **(A)** Caracterización por SDS-PAGE y Western blot de las proteínas λ gal y λ gal-CTSlpA. El Western blot (panel derecho) confirmó la presencia e integridad de las proteínas. **(B)** Caracterización por SDS-PAGE y Western blot de la proteína λ gal-CBDLys. El Western blot (panel derecho) confirmó la presencia e integridad de la proteína. Se utilizó la proteína λ gal-CTSlpA inducida por IPTG (+) como control positivo y la proteína λ gal-CTSlpA sin inducir (-) como control negativo.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877–902.
- Adam, A. C., Rubio-Teixeira, M., & Polaina, J. (2004). Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), 553–557.
- Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Derkx, P. M. F., & Jespersen, L. (2012). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC Microbiology*, 12, 75.
- Allievi, M. C., Ruzal, S. M., & Palomino, M. M. (2019). Modifications of *Lactobacillus* surface under environmental stress conditions. In *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering*. Caister Academic Press.
- Al-Yami, A. M., Al-Mousa, A. T., Al-Otaibi, S. A., & Khalifa, A. Y. (2022). *Lactobacillus* species as probiotics: Isolation sources and health benefits. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(4), 2270–2291.
- Amela, I., Delicado, P., Gómez, A., Bonàs, S., Querol, E., & Cedano, J. (2010). DockAnalyse: an application for the analysis of protein-protein interactions. *BMC Structural Biology*, 10, 37.
- Ashrafi, F., Fallah Mehrabadi, J., Siadat, S. D., & Aghasadeghi, M. R. (2015). Expression and Purification of the Uropathogenic *Escherichia coli* PapG Protein and its Surface Absorption on *Lactobacillus reuteri*: Implications for Surface Display System Vaccines. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(9), e25595.
- Atluri, E., & Yang, V. (2023). *Comparison of bacterial/animal/plant viruses and their effects on humans*. <https://doi.org/10.58445/rars.367>
- Bateman, A., & Bycroft, M. (2000). The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *Journal of Molecular Biology*, 299(4), 1113–1119.
- Beezer, A. E., Newell, R. D., & Tyrrell, H. J. (1976). Application of flow microcalorimetry to analytical problems: the preparation, storage and assay of frozen inocula of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 41(2), 197–207.
- Bengoa, A. A., Dardis, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2021). Health-Promoting Properties of *Lactobacillus paracasei*: A Focus on Kefir Isolates and Exopolysaccharide-Producing Strains.

- Foods*, 10(10), 2239.
- Bengoa, A. A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S. A., Bronsoms, S., Serradell, M. de L. Á., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2018). Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 103, 462–467.
- Bernard, E., Rolain, T., Courtin, P., Guillot, A., Langella, P., Hols, P., & Chapot-Chartier, M.-P. (2011). Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine: a novel structural variation of bacterial peptidoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 23950–23958.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 399S – 405S.
- Bingle, W. H., Nomellini, J. F., & Smit, J. (1997). Cell-surface display of a *Pseudomonas aeruginosa* strain K pilin peptide within the paracrystalline S-layer of *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, 26(2), 277–288.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M., & Siezen, R. J. (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 1), 273–280.
- Bosma, T., Kanninga, R., Neef, J., Audouy, S. A. L., van Roosmalen, M. L., Steen, A., Buist, G., Kok, J., Kuipers, O. P., Robillard, G., & Leenhouts, K. (2006). Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 880–889.
- Brinkman, A. B., Bell, S. D., Lebbink, R. J., de Vos, W. M., & van der Oost, J. (2002). The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 29537–29549.
- Brinster, S., Furlan, S., & Serror, P. (2007). C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1244–1253.
- Bron, P. A., van Baarlen, P., & Kleerebezem, M. (2011). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(1), 66–78.

- Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., & Klaenhammer, T. R. (2005). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8344–8351.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular Microbiology*, 68(4), 838–847.
- Cadore, P. S., Walcher, D. L., Sousa, N. F. G. C. de, Martins, L. H. R., Hora, V. P. da, Groll, A. V., Moura, M. Q. de, Berne, M. E. A., Avila, L. F. da C. de, & Scaini, C. J. (2021). Protective effect of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in BALB/c mice infected with *Toxocara canis*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 63, e9.
- Carević, M., Vukašinović-Sekulić, M., Ćorović, M., Rogniaux, H., Ropartz, D., Veličković, D., & Bezbradica, D. (2018). Evaluation of β -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* as biocatalyst for galacto-oligosaccharides synthesis: Product structural characterization and enzyme immobilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(6), 697–704.
- Cavallero, G. J., Malamud, M., Casabuono, A. C., Serradell, M. de L. Á., & Couto, A. S. (2017). A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated. *Journal of Proteomics*, 162, 20–29.
- Celebioglu, H. U., Olesen, S. V., Prehn, K., Lahtinen, S. J., Brix, S., Hachem, M. A., & Svensson, B. (2017). Data regarding the growth of NCFM on different carbohydrates and recombinant production of elongation factor G and pyruvate kinase. *Data in Brief*, 14, 118–122.
- Cervantes-García, D., Jiménez, M., Rivas-Santiago, C. E., Gallegos-Alcalá, P., Hernández-Mercado, A., Santoyo-Payán, L. S., Loera-Arias, M. de J., Saucedo-Cardenas, O., Montes de Oca-Luna, R., & Salinas, E. (2021). *Lactococcus lactis* NZ9000 Prevents Asthmatic Airway Inflammation and Remodelling in Rats through the Improvement of Intestinal Barrier Function and Systemic TGF- β Production. *International Archives of Allergy and Immunology*, 182(4), 277–291.
- Chapot-Chartier, M.-P. (2014). Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 5, 236.

- Chattopadhyay, S., Do, N. P., Flower, D. R., & Chattopadhyay, A. K. (2023). Extracting prime protein targets as possible drug candidates: machine learning evaluation. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 61(11), 3035–3048.
- Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H., 1956, Microdetermination of Phosphorus. *Analytical Chemistry*, 28:1756-58.
- Chen, C.-S., Hsu, C.-K., & Chiang, B.-H. (2002). Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process Biochemistry (Barking, London, England)*, 38(5), 801–808.
- Claesson, M. J., Van Sinderen, D., & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS microbiology letters*, 269(1), 22-28.
- Clokier, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45.
- Cremon, C., Guglielmetti, S., Gargari, G., Taverniti, V., Castellazzi, A. M., Valsecchi, C., Tagliacarne, C., Fiore, W., Bellini, M., Bertani, L., Gambaccini, D., Cicala, M., Germanà, B., Vecchi, M., Pagano, I., Barbaro, M. R., Bellacosa, L., Stanghellini, V., & Barbara, G. (2018). Effect of CNCM I-1572 on symptoms, gut microbiota, short chain fatty acids, and immune activation in patients with irritable bowel syndrome: A pilot randomized clinical trial. *United European Gastroenterology Journal*, 6(4), 604–613.
- Cui, Y., & Qu, X. (2021). Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 486–499. doi:10.1016/j.tifs.2021.06.058
- Cultivos Genéticamente Modificados - Agricultura, Ganadería y Pesca, fecha de acceso: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/biotecnologia/conabia/_pdf/Cultivos_GM.pdf
- Daniel, C., Roussel, Y., Kleerebezem, M., & Pot, B. (2011). Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in Biotechnology*, 29(10), 499–508.
- DeCastro, M.-E., Escuder-Rodriguez, J.-J., Cerdan, M.-E., Becerra, M., Rodriguez-Belmonte, E., & Gonzalez-Siso, M.-I. (2018). Heat-Loving β -Galactosidases from Cultured and Uncultured

- Microorganisms. *Current Protein & Peptide Science*, 19(12), 1224–1234.
- Deng, K., Chen, T., Wu, Q., Xin, H., Wei, Q., Hu, P., Wang, X., Wang, X., Wei, H., & Shah, N. P. (2015). In vitro and in vivo examination of anticolonization of pathogens by *Lactobacillus paracasei* FJ861111.1. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6759–6766.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., & Hébraud, M. (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiology Letters*, 256(1), 1–15.
- Dieterle, M. E., Bowman, C., Batthyany, C., Lanzarotti, E., Turjanski, A., Hatfull, G., & Piuri, M. (2014). Exposing the secrets of two well-known *Lactobacillus casei* phages, J-1 and PL-1, by genomic and structural analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 7107–7121.
- Dieterle, M. E., Jacobs-Sera, D., Russell, D., Hatfull, G., & Piuri, M. (2014). Complete Genome Sequences of *Lactobacillus* Phages J-1 and PL-1. *Genome Announcements*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00998-13>
- Di Rienzo, T., D'Angelo, G., D'Aversa, F., Campanale, M. C., Cesario, V., Montalto, M., Gasbarrini, A., & Ojetti, V. (2013). Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17 Suppl 2, 18–25.
- Do Carmo, F. L. R., Rabah, H., De Oliveira Carvalho, R. D., Gaucher, F., Cordeiro, B. F., da Silva, S. H., Le Loir, Y., Azevedo, V., & Jan, G. (2018). Extractable Bacterial Surface Proteins in Probiotic-Host Interaction. *Frontiers in Microbiology*, 9, 645.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., ... Fernández Escámez, P. S. (2017). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal. European Food Safety Authority*, 15(3), e04664.
- Eslami, N., Kermanshahi, R. K., & Erfan, M. (2013). Studying the Stability of S-Layer Protein of *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356 in Simulated Gastrointestinal Fluids Using SDS-PAGE and Circular Dichroism.

-
- Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 12(Suppl), 47–56.
- Fidanza, M., Panigrahi, P., & Kollmann, T. R. (2021). Lactiplantibacillus plantarum-nomad and ideal probiotic. *Frontiers in Microbiology*, 12, 712236.
- Figueiredo, T. A., Sobral, R. G., Ludovice, A. M., Almeida, J. M. F. de, Bui, N. K., Vollmer, W., de Lencastre, H., & Tomasz, A. (2012). Identification of genetic determinants and enzymes involved with the amidation of glutamic acid residues in the peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathogens*, 8(1), e1002508.
- Fina Martin, J., Palomino, M. M., Cutine, A. M., Modenutti, C. P., Fernández Do Porto, D. A., Allievi, M. C., Zanini, S. H., Mariño, K. V., Barquero, A. A., & Ruzal, S. M. (2019). Exploring lectin-like activity of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 4839–4857.
- Fischetti, V. A. (2010). Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 300(6), 357–362.
- Fischetti, V. A. (2018). Development of Phage Lysins as Novel Therapeutics: A Historical Perspective. *Viruses*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/v10060310>
- Fontana, A., Zacconi, C., & Morelli, L. (2018). Genetic Signatures of Dairy Group. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2611.
- Fredua-Agyeman, M. (2024). Surviving process and transit: Controlled freeze drying, storage and enteric coated capsules for targeted delivery of probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Heliyon*, 10(7), e28407.
- Gandhi, A., & Shah, N. P. (2016). Effect of salt stress on morphology and membrane composition of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium bifidum*, and their adhesion to human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2594–2605.
- Garcia-Vello, P., Sharma, G., Speciale, I., Molinaro, A., Im, S.-H., & De Castro, C. (2020). Structural features and immunological perception of the cell surface glycans of *Lactobacillus plantarum*: a novel rhamnose-rich polysaccharide and teichoic acids. *Carbohydrate Polymers*, 233, 115857.
- Garriga, M., Rubio, R., Aymerich, T., & Ruas-Madiedo, P. (2015). Potentially probiotic and bioprotective lactic

- acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Beneficial Microbes*, 6(3), 337–343.
- Gómez-Aldapa, C. A., Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Castro-Rosas, J., Guzmán-Ortiz, F. A., Acevedo-Sandoval, O. A., Rangel-Vargas, E., & Falfán-Cortés, R. N. (2023). Survival of alginate-microencapsulated *Lactocaseibacillus paracasei* under gastrointestinal conditions in models in vitro and in vivo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(3), 1–13.
- Gordillo, T. B., Palumbo, M. C., Allievi, M. C., Fernández Do Porto, D. A., Ruzal, S. M., & Palomino, M. M. (2020). Strategies to display heterologous proteins on the cell surface of lactic acid bacteria using as anchor the C-terminal domain of *Lactobacillus acidophilus* SlpA. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 36(11), 169.
- Górska, S., Sandström, C., Schabussova, I., Schwarzer, M., & Zawilak-Pawlik, A. M. (2022). *Probiotic Bacteria-derived Effector Molecules and Their Impact on the Host in Health and Disease*. Frontiers Media SA.
- Guérin, H., Kulakauskas, S., & Chapot-Chartier, M.-P. (2022). Structural variations and roles of rhamnose-rich cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(10), 102488.
- Guillermo Hugo Peralta, María Victoria Beret, María D. Milagros Bürgi, Elisa C. Ale, Luciano J. Martínez, Virginia H. Albarracín, Erica Hynes, Carina Bergamini. Conservación por liofilización de *Lactocaseibacillus paracasei* 90: viabilidad, culturalidad e integridad celular. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/180954>
- Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202–209.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M., & Nürnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science*, 17(8), 495–502.
- Haddaji, N., Mahdhi, A. K., Krifi, B., Ismail, M. B., & Bakhrouf, A. (2015). Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. *FEMS Microbiology Letters*, 362(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv047>

- Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 19–54.
- Han, D.-J., Jun, S.-J., Lee, B.-H., & Yoo, S.-H. (2022). Cryoprotective effect of turanose on lyophilized *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei* 431. *Food Science and Biotechnology*, 31(3), 343–347.
- Hestrin, S. (1949). The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *The Journal of Biological Chemistry*, 180(1), 249–261.
- Hickey, R. M. (2012). The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *International Dairy Journal*, 22(2), 141–146.
- Higaki, S. (2003). Lipase inhibitors for the treatment of acne. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 22(5-6), 377–384.
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2107.
- Hino, M., & Ikebe, N. (1965). Lactic acid bacteria employed for beverage production. II. Isolation and some properties of a bacteriophage isolated during the fermentation of lactic acid beverage.
- Hong, K. B., Kim, J. H., Kwon, H. K., Han, S. H., Park, Y., & Suh, H. J. (2016). Evaluation of Prebiotic Effects of High-Purity Galactooligosaccharides and. *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), 156–163.
- Husain, Q. (2010). Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41–62.
- Hu, S., Kong, J., Kong, W., Guo, T., & Ji, M. (2010). Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2410–2418.
- Hu, S., Kong, J., Sun, Z., Han, L., Kong, W., & Yang, P. (2011). Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the s-layer protein. *Microbial Cell Factories*, 10, 86.
- Hymes, J. P., Johnson, B. R., Barrangou, R., & Klaenhammer, T. R. (2016). Functional Analysis of an S-Layer-Associated Fibronectin-Binding Protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 82(9), 2676–2685.
- Hynönen, U., Kant, R., Lähteinen, T., Pietilä, T. E., Beganović, J., Smidt, H., Uroić, K., Avall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2014). Functional characterization of probiotic surface layer protein-carrying *Lactobacillus amylovorus* strains. *BMC Microbiology*, 14, 199.
- Hynönen, U., & Palva, A. (2013). *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5225–5243.
- Ishibashi, K., Takesue, S., Watanabe, K., & Oishi, K. (1982). Use of lectins to characterize the receptor sites for bacteriophage PL-1 of *Lactobacillus casei*. *Microbiology (Reading, England)*, 128(10), 2251–2259.
- Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2017). Probiotic Strain BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 8, 1553.
- Jalali, M., Abedi, D., Varshosaz, J., Najjarzadeh, M., Mirlohi, M., & Tavakoli, N. (2012). Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 31–36.
- Jastrebow Iara, Estudio del dominio carboxilo terminal de SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 para la exhibición de proteínas heterólogas en la superficie de bacterias ácido lácticas (2024). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Jones, R. M. (2017). The use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in clinical trials for the improvement of human health. In *The microbiota in gastrointestinal pathophysiology* (pp. 99-108). Academic Press.
- Jose, J., Betscheider, D., & Zangen, D. (2005). Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 346(2), 258–267.
- Kalyanasundram, J., Chia, S. L., Song, A. A.-L., Raha, A. R., Young, H. A., & Yusoff, K. (2015). Surface display of glycosylated Tyrosinase related protein-2 (TRP-2) tumour antigen on *Lactococcus lactis*. *BMC Biotechnology*, 15, 113.
- Kandler, O. (1986). Genus *lactobacillus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Karimi, G., Sabran, M. R., Jamaluddin, R., Parvaneh, K., Mohtarrudin, N., Ahmad, Z., Khazaai, H., &

- Khodavandi, A. (2015). The anti-obesity effects of *Lactobacillus casei* strain Shirota versus Orlistat on high fat diet-induced obese rats. *Food & Nutrition Research*, 59, 29273.
- Kashige, N., Nakashima, Y., Miake, F., & Watanabe, K. (2000). Cloning, sequence analysis, and expression of *Lactobacillus casei* phage PL-1 lysis genes. *Archives of Virology*, 145(8), 1521–1534.
- Kawana, K., Adachi, K., Kojima, S., Taguchi, A., Tomio, K., Yamashita, A., Nishida, H., Nagasaka, K., Arimoto, T., Yokoyama, T., Wada-Hiraike, O., Oda, K., Sewaki, T., Osuga, Y., & Fujii, T. (2014). Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine*, 32(47), 6233–6239.
- Kéry, V., Kucár, S., Matulová, M., & Haplová, J. (1991). Immobilisation of beta-D-galactosidase from *Escherichia coli* on cellulose beads and its use for the synthesis of disaccharide derivatives. *Carbohydrate Research*, 209, 83–87.
- Khedr, O. M. S., El-Sonbaty, S. M., Moawed, F. S. M., Kandil, E. I., & Abdel-Maksoud, B. E. (2021). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Exopolysaccharides Suppresses Mediators of Inflammation through the Inhibition of TLR2/STAT-3/P38-MAPK Pathway in DEN-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats. *Nutrition and Cancer*, 1037–1047.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W. E. J., Stiekema, W., Lankhorst, R. M. K., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M., & Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1990–1995.
- Klotz, C., & Barrangou, R. (2018). Engineering Components of the S-Layer for Biotherapeutic Applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2264.
- Kobierecka, P., Wyszynska, A., Maruszewska, M., Wojtania, A., Żylińska, J., Bardowski, J., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2015). Lactic acid bacteria as a surface display platform for *Campylobacter jejuni* antigens. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 1–10.
- Korcz, E., Kerényi, Z., & Varga, L. (2018). Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by

- lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food & Function*, 9(6), 3057–3068.
- Kutter, E., Raya, R., & Carlson, K. (2005). Molecular mechanisms of phage infection.
- Larsson, J. M. H., Karlsson, H., Crespo, J. G., Johansson, M. E. V., Eklund, L., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2011). Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(11), 2299–2307.
- Lebeer, S., Bron, P. A., Marco, M. L., Van Pijkeren, J.-P., O'Connell Motherway, M., Hill, C., Pot, B., Roos, S., & Klaenhammer, T. (2018). Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 217–223.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L. P., Verhoeven, T. L. A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., Vos, W. M. de, Keersmaecker, S. C. J. D., & Vanderleyden, J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 185–193.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 171–184.
- Lee, N. Y., Shin, M. J., Youn, G. S., Yoon, S. J., Choi, Y. R., Kim, H. S., Gupta, H., Han, S. H., Kim, B. K., Lee, D. Y., Park, T. S., Sung, H., Kim, B. Y., & Suk, K. T. (2021). *Lactobacillus* attenuates progression of nonalcoholic fatty liver disease by lowering cholesterol and steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 27(1), 110–124.
- Lee, S. Y., Choi, J. H., & Xu, Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology*, 21(1), 45–52.
- Lehri, B., Seddon, A. M., & Karlyshev, A. V. (2015). *Lactobacillus fermentum* 3872 genome sequencing reveals plasmid and chromosomal genes potentially involved in a probiotic activity. *FEMS Microbiology Letters*, 362(11). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv068>
- Liam J. McGuffin, Kevin Bryson, David T. Jones. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404–405.

- Lifran, E. V., Hourigan, J. A., Sleight, R. W., & Johnson, R. L. (2000). New wheys for lactose. *Food Australia*, 52(4), 120-125.
- Lin, K.-H., Hsu, A.-P., Shien, J.-H., Chang, T.-J., Liao, J.-W., Chen, J.-R., Lin, C.-F., & Hsu, W.-L. (2012). Avian reovirus sigma C enhances the mucosal and systemic immune responses elicited by antigen-conjugated lactic acid bacteria. *Vaccine*, 30(33), 5019–5029.
- Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal*, 15(4), 391–398.
- Liu, H., Hu, Z., Li, M., Yang, Y., Lu, S., & Rao, X. (2023). Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria. *Journal of Biomedical Science*, 30(1), 1–18.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. *Lactic Acid Bacteria*, 103–203.
- Liu, Y., Nawazish, H., Farid, M. S., Abdul Qadoos, K., Habiba, U. E., Muzamil, M., Tanveer, M., Sienkiewicz, M., Lichota, A., & Łopusiewicz, Ł. (2024). Health-Promoting Effects of *Lactobacillus acidophilus* and Its Technological Applications in Fermented Food Products and Beverages. *Fermentation*, 10(8), 380.
- Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage endolysins – current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 480–487.
- Mahmoodian, S., Fatemi, S. S.-A., Shamsara, M., Chaharmahali, M., Meimandipour, A., & Maniee, S. A. (2024). Impact of protectants and the method of preservation on the stability of potentially probiotic bacteria. *Cryobiology*, 116, 104912.
- Malamud, M., Bolla, P. A., Carasi, P., Gerbino, E., Gómez-Zavaglia, A., Mobili, P., & Serradell, M. de L. A. (2019). S-layer proteins from lactobacilli: Biogenesis, structure, functionality and biotechnological applications. In *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering*. Caister Academic Press.
- Mangiagalli, M., & Lotti, M. (2021). Cold-Active β -Galactosidases: Insight into Cold Adaption Mechanisms and Biotechnological Exploitation. *Marine Drugs*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/md19010043>
- Mao, R., Wu, D., & Wang, Y. (2016). Surface display on lactic acid bacteria without genetic modification: strategies and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), 9407–9421.

- Mao, R., Zhou, K., Han, Z., & Wang, Y. (2016). Subtilisin QK-2: secretory expression in *Lactococcus lactis* and surface display onto gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. *Microbial Cell Factories*, 15, 80.
- Marelli, B., Perez, A. R., Banchio, C., de Mendoza, D., & Magni, C. (2011). Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice. *Journal of Virological Methods*, 175(1), 28–37.
- Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A., & Schwede, T. (2013). IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(21), 2722–2728.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Martínez, M. G., Prado Acosta, M., Candurra, N. A., & Ruzal, S. M. (2012). S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 590–595.
- Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., & Yoshikai, Y. (2003). Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(2), 259–266.
- McCarthy, M., & Culloty, S. C. (2011). Optimization of two immunofluorescent antibodies for the detection of *Escherichia coli* using immunofluorescent microscopy and flow cytometry. *Current Microbiology*, 62(2), 402–408.
- Metchnikoff, Élie, & Binnie, Francis G. (1907). *Immunity in infective diseases*. University Press. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.31465>
- Meng, J., Gao, S.-M., Zhang, Q.-X., & Lu, R.-R. (2015). Murein hydrolase activity of surface layer proteins from *Lactobacillus acidophilus* against *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 527–532.
- Merck Sharp & Dohme Corp. (s.f.). *Generalidades sobre la función biliar*. Manual MSD.

- <https://www.merckmanuals.com/es-us/professional/trastornos-hep%C3%A1ticos-y-biliares/trastornos-de-la-ves%C3%ADcula-biliar-y-los-conductos-biliares/generalidades-sobre-la-funci%C3%B3n-biliar>
- Meryman, H. T. (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8(2), 173–183.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679–682.
- M.K. Lee, M.Y. Kim, S. Kim, J. Lee, Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate, *J Pharm Sci*, 98 (2009) 4808-4817.
- Moeini, H., Rahim, R. A., Omar, A. R., Shafee, N., & Yusoff, K. (2011). Lactobacillus acidophilus as a live vehicle for oral immunization against chicken anemia virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 77–88.
- Moineau, S., & Levesque, C. (2005). Control of bacteriophages in industrial fermentations Bacteriophages: Biology and Applications, Eds Kutter E., Sulakvelidze A.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463–6472.
- Moorthy, G., & Ramasamy, R. (2007). Mucosal immunisation of mice with malaria protein on lactic acid bacterial cell walls. *Vaccine*, 25(18), 3636–3645.
- Muñoz-Provencio, D., Rodríguez-Díaz, J., Collado, M. C., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., & Monedero, V. (2012). Functional analysis of the Lactobacillus casei BL23 sortases. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8684–8693.
- Nealon, N. J., Worcester, C. R., & Ryan, E. P. (2017). Lactobacillus paracasei metabolism of rice bran reveals metabolome associated with Salmonella Typhimurium growth reduction. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1639–1656.
- Nguyen-Duc, T., van Oeffelen, L., Song, N., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Muyldermans, S., Charlier, D., & Peeters, E. (2013). The genome-wide binding profile of the Sulfolobus solfataricus transcription factor

- Ss-LrpB shows binding events beyond direct transcription regulation. *BMC Genomics*, 14(1), 828.
- Nguyen, T.-H., Splechtna, B., Krasteva, S., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Divne, C., & Haltrich, D. (2007). Characterization and molecular cloning of a heterodimeric beta-galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiology Letters*, 269(1), 136–144.
- Nishiyama, K., Sugiyama, M., & Mukai, T. (2016). Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030034>
- Niu, L., Gao, M., Ren, H., De, X., Jiang, Z., Zhou, X., Liu, R., Li, H., Duan, H., Zhang, C., Wang, F., & Ge, J. (2024). A novel bacterium-like particles platform displaying antigens by new anchoring proteins induces efficacious immune responses. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1395837.
- Núñez, I. N., Galdeano, C. M., de LeBlanc, A. de M., & Perdígón, G. (2014). Evaluation of immune response, microbiota, and blood markers after probiotic bacteria administration in obese mice induced by a high-fat diet. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(11-12), 1423–1432.
- O’Flaherty, S., Briner Crawley, A., Theriot, C. M., & Barrangou, R. (2018). The Bile Salt Hydrolase Repertoire Reveals Niche-Specific Adaptation. *mSphere*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00140-18>
- O’Flaherty, S., & Klaenhammer, T. R. (2016). Multivalent Chromosomal Expression of the Clostridium botulinum Serotype A Neurotoxin Heavy-Chain Antigen and the Bacillus anthracis Protective Antigen in *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(20), 6091–6101.
- Oleksy, M., & Klewicka, E. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(3), 450–462.
- Oliveira, C., Guimarães, P. M. R., & Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29(6), 600–609.
- Öner, E. T. (2013). Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries* (pp. 35–56). Springer Berlin Heidelberg.
- Ortakci, F., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of Dairy Science*, 95(12),

6918–6925.

- Pacini, M. F., González, F. B., Dinatale, B., Bulfoni Balbi, C., Villar, S. R., Farré, C., Lupi, G., Espariz, M., Blancato, V. S., Magni, C., Marcipar, I., & Pérez, A. R. (2022). Nasal immunization with a *L. lactis*-derived trans-sialidase antigen plus c-di-AMP protects against acute oral *T. cruzi* infection. *Vaccine*, *40*(15), 2311–2323.
- Palomino, M. M., Allievi, M. C., Gordillo, T. B., Bockor, S. S., Fina Martin, J., & Ruzal, S. M. (2023). Surface layer proteins in species of the family Lactobacillaceae. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14230>
- Palomino, M. M., Allievi, M. C., Gründling, A., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2013). Osmotic stress adaptation in *Lactobacillus casei* BL23 leads to structural changes in the cell wall polymer lipoteichoic acid. *Microbiology*, *159*(Pt 11), 2416–2426.
- Palomino, M. M., Waehner, P. M., Fina Martin, J., Ojeda, P., Malone, L., Sánchez Rivas, C., Prado Acosta, M., Allievi, M. C., & Ruzal, S. M. (2016). Influence of osmotic stress on the profile and gene expression of surface layer proteins in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(19), 8475–8484.
- Pan, W.-H., Li, P.-L., & Liu, Z. (2006). The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, *12*(3), 148–152.
- Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*, *2010*, 473137.
- Panwar, R., Kumar, N., Kashyap, V., Singh, S., & Singh, H. (2017). Insights into involvement of S-layer proteins of probiotic *Lactobacilli* in relation to gut health. *Octa Journal of Environmental Research*, *5*(4).
- Park, S., Kang, J., Choi, S., Park, H., Hwang, E., Kang, Y.-G., Kim, A.-R., Holzapfel, W., & Ji, Y. (2018). Correction: Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and its influence on the gut microbiome and propionate level in a murine model. *PLoS One*, *13*(11), e0208294.
- Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V. A., & Huang, D. B. (2013). Lysoins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *Journal of Medical Microbiology*, *62*(Pt 10), 1506–1516.

-
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., Audero, G., Páez, R., Wolf, I. V., Perotti, M. C., & Hynes, E. R. (2017). Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 17–24.
- Percy, M. G., & Gründling, A. (2014). Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 68, 81–100.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pham, M.-L., Tran, A.-M., Kittibunchakul, S., Nguyen, T.-T., Mathiesen, G., & Nguyen, T.-H. (2019). Immobilization of β -Galactosidases on the Cell Surface Using the Peptidoglycan-Binding Motif LysM. *Catalysts (Basel, Switzerland)*, 9(5), 443.
- Pianetti, A., Battistelli, M., Citterio, B., Parlani, C., Falcieri, E., & Bruscolini, F. (2009). Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 40(4), 426–433.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2003). Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 372–379.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2005). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 84–95.
- Poolman, B., Blount, P., Folgering, J. H. A., Friesen, R. H. E., Moe, P. C., & van der Heide, T. (2002). How do membrane proteins sense water stress? *Molecular Microbiology*, 44(4), 889–902.
- Prado-Acosta, M., Ruzal, S. M., Allievi, M. C., Palomino, M. M., & Sanchez Rivas, C. (2010). Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* surface layer and nisin on bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 974–977.
- Qin, J., Wang, X., Kong, J., Ma, C., & Xu, P. (2014). Construction of a food-grade cell surface display system for *Lactobacillus casei*. *Microbiological Research*, 169(9-10), 733–740.
- Qu, L., Ren, J., Huang, L., Pang, B., Liu, X., Liu, X., Li, B., & Shan, Y. (2018). Antidiabetic Effects of *Lactobacillus*

- casei Fermented Yogurt through Reshaping Gut Microbiota Structure in Type 2 Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(48), 12696–12705.
- Radziwill-Bienkowska, J. M., Robert, V., Drabot, K., Chain, F., Cherbuy, C., Langella, P., Thomas, M., Bardowski, J. K., Mercier-Bonin, M., & Kowalczyk, M. (2017). Contribution of plasmid-encoded peptidase S8 (PrtP) to adhesion and transit in the gut of *Lactococcus lactis* IBB477 strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(14), 5709–5721.
- Raha, A. R., Varma, N. R. S., Yusoff, K., Ross, E., & Foo, H. L. (2005). Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 75–81.
- Ramasamy, R., Yasawardena, S., Zomer, A., Venema, G., Kok, J., & Leenhouts, K. (2006). Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunisations. *Vaccine*, 24(18), 3900–3908.
- Ramiah, K., van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2009). Expression of the Mucus Adhesion Gene Mub, Surface Layer Protein Slp and Adhesion-Like Factor EF-TU of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Under Digestive Stress Conditions, as Monitored with Real-Time PCR. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1(1), 91.
- Raso, M. M., Vassallo, O., Micoli, F., & Giannelli, C. (2021). Comparison and Optimization of Quantification Methods for Serotype 6 O-antigen Containing Galacturonic Acid and Methyl-Pentose. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212160>
- Riaz Rajoka, M. S., Wu, Y., Mehwish, H. M., Bansal, M., & Zhao, L. (2020). *Lactobacillus* exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 36–48.
- Ribelles, P., Benbouziane, B., Langella, P., Suárez, J. E., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2013). Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1231–1239.

- Ribelles, P., Rodríguez, I., & Suárez, J. E. (2012). LysA2, the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 lysin is an endopeptidase active on a wide spectrum of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(1), 101–110.
- Roach, D. R., Khatibi, P. A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., & Donovan, D. M. (2013). Bacteriophage-encoded lytic enzymes control growth of contaminating *Lactobacillus* found in fuel ethanol fermentations. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 20.
- Rocha-Ramírez, L. M., Pérez-Solano, R. A., Castañón-Alonso, S. L., Moreno Guerrero, S. S., Ramírez Pacheco, A., García Garibay, M., & Eslava, C. (2017). Probiotic Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2017, 4607491.
- Rodríguez-Rodríguez, P., Arribas, S. M., de Pablo, A. L. L., González, M. C., Abderrahim, F., & Condezo-Hoyos, L. (2013). A simple dot-blot-Sirius red-based assay for collagen quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), 6863–6871.
- Rodríguez-Rubio, L., Gutiérrez, D., Donovan, D. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(3), 542–552.
- Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843–856.
- Ruiz-Rodríguez, L., Bleckwedel, J., Eugenia Ortiz, M., Pescuma, M., & Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria. In *Industrial Biotechnology* (pp. 395–451). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Ruiz-Rodriguez, M., & Rello, J. (2017). Human microbiome in respiratory diseases. *Annals of Translational Medicine*, 5(12), 248.
- Sable, S., & Lortal, S. (1995). The lysins of bacteriophages infecting lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(1), 1–6.
- Sagmeister, A., Matter, C. M., Stähli, B. E., & Scharl, M. (2024). The Gut-Heart Axis: Effects of Intestinal Microbiome Modulation on Cardiovascular Disease-Ready for Therapeutic Interventions? *International*

- Journal of Molecular Sciences*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/ijms252413529>
- Sahay, B., Ge, Y., Colliou, N., Zadeh, M., Weiner, C., Mila, A., Owen, J. L., & Mohamadzadeh, M. (2015). Advancing the use of *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A for the treatment of intestinal disorders in humans. *Gut Microbes*, 6(6), 392–397.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., & Tassaduq, R. (2017). Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech*, 7(1), 79.
- Sato, J., Kanazawa, A., Azuma, K., Ikeda, F., Goto, H., Komiya, K., Kanno, R., Tamura, Y., Asahara, T., Takahashi, T., Nomoto, K., Yamashiro, Y., & Watada, H. (2017). Probiotic reduces bacterial translocation in type 2 diabetes mellitus: A randomised controlled study. *Scientific Reports*, 7(1), 12115.
- Schmelcher, M., Tchang, V. S., & Loessner, M. J. (2011). Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microbial Biotechnology*, 4(5), 651–662.
- Schneewind, O., & Missiakas, D. M. (2012). Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1592), 1123–1139.
- Schwab, C., Sørensen, K. I., & Gänzle, M. G. (2010). Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42 β -galactosidases of lactic acid bacteria in *Lactococcus lactis*. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 300–307.
- Sechaud, L., Cluzel, P. J., Rousseau, M., Baumgartner, A., & Accolas, J. P. (1988). Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie*, 70(3), 401–410.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111–122.
- Selle, K., Goh, Y. J., Johnson, B. R., O'Flaherty, S., Andersen, J. M., Barrangou, R., & Klaenhammer, T. R. (2017). Deletion of Lipoteichoic Acid Synthase Impacts Expression of Genes Encoding Cell Surface Proteins in. *Frontiers in Microbiology*, 8, 553.
- Selle, K., Goh, Y. J., O'Flaherty, S., & Klaenhammer, T. R. (2014). Development of an integration mutagenesis

- system in *Lactobacillus gasseri*. *Gut Microbes*, 5(3), 326–332.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*, 2013(1), 237921.
- Shiraishi, T., Yokota, S., Fukiya, S., & Yokota, A. (2016). Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35(4), 147–161.
- Shu, X., Leiderman, P., Gepshtein, R., Smith, N. R., Kallio, K., Huppert, D., & Remington, S. J. (2007). An alternative excited-state proton transfer pathway in green fluorescent protein variant S205V. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 16(12), 2703–2710.
- Sicard, J.-F., Le Bihan, G., Vogeleer, P., Jacques, M., & Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 387.
- Sleytr, U. B. (2016). *Curiosity And Passion For Science And Art*. World Scientific.
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E.-M., & Pum, D. (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 823–864.
- Smit, E., Oling, F., Demel, R., Martinez, B., & Pouwels, P. H. (2001). The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *Journal of Molecular Biology*, 305(2), 245–257.
- Soares, J. M. D., Abreu, R. E. F., Costa, M. M. da, Melo, N. F. de, & Oliveira, H. P. de. (2020). Investigation of *Lactobacillus paracasei* encapsulation in electrospun fibers of Eudragit® L100. *Polímeros*, 30(3). <https://doi.org/10.1590/0104-1428.03020>
- Sommer, F., Adam, N., Johansson, M. E. V., Xia, L., Hansson, G. C., & Bäckhed, F. (2014). Altered mucus glycosylation in core 1 O-glycan-deficient mice affects microbiota composition and intestinal architecture. *PLoS One*, 9(1), e85254.
- Song, N., Nguyen Duc, T., van Oeffelen, L., Muyldermans, S., Peeters, E., & Charlier, D. (2013). Expanded target and cofactor repertoire for the transcriptional activator LysM from *Sulfolobus*. *Nucleic Acids*

- Research*, 41(5), 2932–2949.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K. J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A. L., Venema, G., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23874–23881.
- Stevenson, G. A., Kirshner, D., Bennion, B. J., Yang, Y., Zhang, X., Zemla, A., Torres, M. W., Epstein, A., Jones, D., Kim, H., Bennett, W. F. D., Wong, S. E., Allen, J. E., & Lightstone, F. C. (2023). Clustering Protein Binding Pockets and Identifying Potential Drug Interactions: A Novel Ligand-Based Featurization Method. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(21), 6655–6666.
- Surya, W., Honey, S. S., & Torres, J. (2024). Flavivirus Zika NS4A protein forms large oligomers in liposomes and in mild detergent. *Scientific Reports*, 14(1), 12533.
- Tarahomjoo, S., Katakura, Y., Satoh, E., & Shioya, S. (2008). Bidirectional cell-surface anchoring function of C-terminal repeat region of peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(2), 116–121.
- Tay, P. K. R., Lim, P. Y., & Ow, D. S.-W. (2020). A SH3_5 Cell Anchoring Domain for Non-recombinant Surface Display on Lactic Acid Bacteria. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 614498.
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Žídek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S. A. A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, 596(7873), 590–596.
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4252–4257.
- Turner, M. S., Hafner, L. M., Walsh, T., & Giffard, P. M. (2004). Identification and characterization of the novel LysM domain-containing surface protein Sep from *Lactobacillus fermentum* BR11 and its use as a peptide fusion partner in *Lactobacillus* and *Lactococcus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3673–3680.
- Umelo-Njaka, E., Nomellini, J. F., Bingle, W. H., Glasier, L. G., Irvin, R. T., & Smit, J. (2001). Expression and

- testing of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine candidate proteins prepared with the *Caulobacter crescentus* S-layer protein expression system. *Vaccine*, 19(11-12), 1406–1415.
- Uriza, P. J., Trautman, C., Palomino, M. M., Fina Martin, J., Ruzal, S. M., Roset, M. S., & Briones, G. (2020). Development of an Antigen Delivery Platform Using Decorated With Heterologous Proteins: A Sheep in Wolf's Clothing Story. *Frontiers in Microbiology*, 11, 509380.
- Van Tassell, M. L., & Miller, M. J. (2011). Lactobacillus adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613–636.
- Varma, N. R. S., Toosa, H., Foo, H. L., Alitheen, N. B. M., Nor Shamsudin, M., Arbab, A. S., Yusoff, K., & Abdul Rahim, R. (2013). Display of the Viral Epitopes on *Lactococcus lactis*: A Model for Food Grade Vaccine against EV71. *Biotechnology Research International*, 2013, 431315.
- Vasquez, R., Bagon, B. B., Song, J. H., Han, N. S., & Kang, D.-K. (2022). A novel, non-GMO surface display in *Limosilactobacillus fermentum* mediated by cell surface hydrolase without anchor motif. *BMC Microbiology*, 22(1), 190.
- Veyrier, F. J., Williams, A. H., Mesnage, S., Schmitt, C., Taha, M.-K., & Boneca, I. G. (2013). De-O-acetylation of peptidoglycan regulates glycan chain extension and affects in vivo survival of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology*, 87(5), 1100–1112.
- Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Grard, T., & Chapot-Chartier, M.-P. (2016). Structural studies of the rhamnose-rich cell wall polysaccharide of *Lactobacillus casei* BL23. *Carbohydrate Research*, 435, 156–161.
- Visweswaran, G. R. R., Leenhouts, K., van Roosmalen, M., Kok, J., & Buist, G. (2014). Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4331–4345.
- Visweswaran, G. R. R., Steen, A., Leenhouts, K., Szeliga, M., Ruban, B., Hesseling-Meinders, A., Dijkstra, B. W., Kuipers, O. P., Kok, J., & Buist, G. (2013). AcuD, a homolog of the major autolysin AcmA of *Lactococcus lactis*, binds to the cell wall and contributes to cell separation and autolysis. *PloS One*, 8(8), e72167.
- Vizoso Pinto, M. G., Rodriguez Gómez, M., Seifert, S., Watzl, B., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2009). Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29

- intestinal epithelial cells in vitro. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 86–93.
- Vukov, N., Moll, I., Bläsi, U., Scherer, S., & Loessner, M. J. (2003). Functional regulation of the *Listeria monocytogenes* bacteriophage A118 holin by an intragenic inhibitor lacking the first transmembrane domain. *Molecular Microbiology*, 48(1), 173–186.
- Wang, G.-Q., Pu, J., Yu, X.-Q., Xia, Y.-J., & Ai, L.-Z. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066–3075.
- Watanabe, K., Takesue, S., Jin-Nai, K., & Yoshikawa, T. (1970). Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology*, 20(3), 409–415.
- Wendel, U. (2021). Assessing viability and stress tolerance of probiotics-A review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 818468.
- Whitehead, K., Versalovic, J., Roos, S., & Britton, R. A. (2008). Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1812–1819.
- Wu, P., Zhu, Q., Yang, R., Mei, Y., Chen, Z., & Liang, Y. (2021). Differences in Acid Stress Response of Zhang Cultured from Solid-State Fermentation and Liquid-State Fermentation. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091951>
- Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I., Allonsius, C. N., Pasolli, E., Segata, N., & Lebeer, S. (2017). Large-Scale Phylogenomics of the Group Highlights Taxonomic Inconsistencies and Reveals Novel Clade-Associated Features. *mSystems*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00061-17>
- Wyszyńska, A., Kobińska, P., Bardowski, J., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2015). Lactic acid bacteria--20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2967–2977.
- Xu, W., Huang, M., Zhang, Y., Yi, X., Dong, W., Gao, X., & Jia, C. (2011). Novel surface display system for heterogenous proteins on *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, 53(6), 641–648.
- Yokokura, T. (1977). Phage receptor material in *Lactobacillus casei*. *Journal of General Microbiology*, 100(1),

139–145.

- Zadravec, P., Štrukelj, B., & Berlec, A. (2015). Heterologous surface display on lactic acid bacteria: non-GMO alternative? *Bioengineered*, 6(3), 179–183.
- Zárate, G., & Nader-Macias, M. E. (2006). Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochemistry (Barking, London, England)*, 41(8), 1779–1785.
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., & Uden, G. (2006). Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(3), 421–429.
- Zhang, B., Zuo, F., Yu, R., Zeng, Z., Ma, H., & Chen, S. (2015). Comparative genome-based identification of a cell wall-anchored protein from *Lactobacillus plantarum* increases adhesion of *Lactococcus lactis* to human epithelial cells. *Scientific Reports*, 5, 14109.
- Zhang, X., Hu, S., Du, X., Li, T., Han, L., & Kong, J. (2016). Heterologous expression of carcinoembryonic antigen in *Lactococcus lactis* via LcsB-mediated surface displaying system for oral vaccine development. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 49(6), 851–858.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus : Description of 23 novel genera, emended description of the genus Beijerinck 1901, and union of and. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858.
- Zhen, N., Zeng, X., Wang, H., Yu, J., Pan, D., Wu, Z., & Guo, Y. (2020). Effects of heat shock treatment on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* after freeze-drying. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 136, 109507.