514

90882

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

Casa abierta al tiempo

EFECTO DEL OXIGENO EN EL METABOLISMO DE GLUCOSA DE *Bifidobacterium infantis.*

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

P r e s e n t a:

M. en B. RINA MARIA GONZALEZ CERVANTES

COMITE TUTORAL:

TUTORA DRA. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE

ASESOR: DR. RAFAEL ZUBILLAGA LUNA

ASESORA: DRA. AMELIA FARRES GONZALEZ-SARABIA

MEXICO, D. F. AGOSTO DE 2005

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

"El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del Mismo consejo, con el convenio PFP-20-93".

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en B. Rina María González Cervantes

El día 22 de Agosto de 2005

Jurado:

Directora:

Ma. del Carmen Wacher

Dra, Ma. del Carmen Wacher Rodarte.

Asesora:

Dra. Amelia Farrés González-Sarabia

Asesor:

Dr. Rafael Zubillaga Luna

Sinodal:

Dr. Mariano García Garibay

Sinodal:

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

El proyecto de esta tesis doctoral se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Sistemas Biológicos en la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco; y en el Laboratorio 324, del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Wacher Rodarte por su dedicación, apoyo y sobre todo paciencia, durante todo el proceso en la elaboración de esta tesis.

A los miembros de mi comité tutoral Dra. Amelia Farrés y Dr. Rafael Zubillaga por sus comentarios y por su apoyo.

A los miembros del jurado Dr. Gerardo Saucedo Castañedo y Dr. Mariano García Garibay, por su contribución a la discusión del trabajo.

Al Ing. Abel Blancas de la Planta Piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su asesoría y contribución al manejo de los fermentadores.

A la M. en C. Rocío Santillana de la Facultad de Química, UNAM y M. en B. Carmen Fajardo del Depto. De Biotecnología, UAM-Iztapalapa, por su asesoría en el manejo del HPLC.

Al M. en B. Rubén Priego, por su asistencia en la toma de muestras de las fermentaciones.

A mis compañeros de grupo de la UAM Alejandro Azaola, Patricia Martínez, Esteban Barranco y Lino Mayorga por su apoyo y contribución a la discusión de mi trabajo; y con quienes tengo la suerte no solo de colaborar académicamente sino de contar con su amistad.

A todos mis amigos que no se cansaron de insistir para que yo culminara esta meta, Elia Velásquez, Elsa Ibarra, Rocío Santillana, Gloria Díaz, Martha Giles, Adelfo Escalante, Wendy Miranda, Teresita Sáinz, Julia Pérez, Abel Blancas y Oscar Monroy.

A Leticia Ramírez y Miguel Tello, a quienes considero mi segunda familia.

A mi Tía Ruth, que con su cariño y múltiples oraciones contribuyó de forma importante a la realización de esta tesis.

Este trabajo de tesis lo dedico especialmente a Valeria y a mi mamá, con todo mi amor.....

Agosto, 2005.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO II. ANTECEDENTES	5
2.1 Probióticos.	5
2.2 El género *Bifidobacterium.*	8
2.3 *Bifidobacterium* como probiótico.	16
2.3.1 *Bifidobacterium* y sus efectos benéficos en la salud humana.	16
2.3.1.1 Interferencia bacteriana	16
2.3.1.2 Producción de vitaminas.	17
2.3.1.3 Efectos inmunomodulatorios y actividad antitumoral.	17
2.3.1.4 Disminución de disturbios intestinales.	19
2.3.1.5 Mejoramiento en la digestión de lactosa.	20
2.3.1.6 Disminución de colesterol en suero.	21
2.3.1.7 Desconjugación de ácidos biliares.	21
2.4 Anaerobiosis estricta, facultativa, microaerofílica y aerotolerancia.	21
2.5 Tolerancia al oxígeno en bifidobacterias.	25
CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
CAPITULO IV. HIPÓTESIS	29
CAPITULO V. OBJETIVOS	30

CAPITULO VI. MATERIAL Y MÉTODOS 31

6.1 Cepa. 31

6.2 Preparación del inóculo. 31

6.3 Condiciones de fermentación 32

6.3.1 Fermentación en viales 32

6.3.2 Fermentación en reactores. 32

6.3.2.1 Fermentación aerobia. 32

6.3.2.2 Fermentación aireada. 32

6.4 Métodos analítico. 33

6.4.1 Crecimiento. 33

6.4.2 Cuantificación de Glucosa, Acetato, Lactato y Formato 33

6.5 Estimación de los parámetros cinéticos 34

6.6 Determinación de k_La y QO_2. 34

CAPITULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 36

7.1 Fermentaciones anaerobias. 36

7.1.1 Selección de ambiente para crear condiciones anaerobias. 36

7.1.2 Efecto del Bióxido de Carbono en la fisiología de bacterias. 40

7.2 Fermentaciones aireadas 43

7.2.1 Crecimiento y consumo de oxígeno 43

7.2.2 Tasa específica de consumo de oxígeno (QO_2). 47

7.2.3 Relación entre QO_2 y NADH oxidasa. 49

7.2.4 Efecto de la aireación sobre la producción de biomasa y metabolitos. 49

7.2.5 Cinética de las fermentaciones en condiciones anaerobias y aireadas. 56

7.2.6 Determinación de k_La y análisis del sistema de aireación. 61

7.2.7. Comportamiento de pH 63

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES 65

CAPITULO IX. RECOMENDACIONES 66

REFERENCIAS 67

APENDICES 76

1.- Viabilidad de *B. Infantis* en el inóculo. 76

2.- Comportamiento de pH en fermentaciones anaerobias y aireadas 77

FIGURAS

No.	Titulo	Pag.
1	Fotografía electrónica de bifidobacterias	8
2	Metabolismo de glucosa por la vía de la fructosa 6 fosfato fosfocetolasa por *Bifidobacterium.*	13
3	Esquema simplificado del metabolismo de glucosa y ruta alternativa de la utilización del piruvato en bifidobacterias.	15
4	Crecimiento de *B. infantis* en viales burbujeados con N_2 de alta pureza	36
5	Crecimiento de *B. infantis* en fermentador burbujeado con nitrógeno de alta pureza.	39
6	Crecimiento de *B. infantis* en fermentador burbujeado con una mezcla de nitrógeno al 80% y CO_2 al 20%	40
7	Crecimiento de *B. infantis* en un reactor con CO_2 al 99%	40
8	Evolución del porcentaje de oxígeno disuelto (% OD) al inocular con *B. Infantis* en condiciones de saturación de oxígeno	43
9	Perfil de % de OD en medio TPYG sin células y con células con un flujo de aire de 0.02 vvm.	44
10	Perfil de % de OD en medio TPYG sin células y con células con un flujo de aire de 0.04 vvm,	45
11	Crecimiento y perfil de O_2 en condiciones anaerobias y aireadas.	46
12	Parámetros cinéticos en fermentaciones anaerobias y aireadas.	57

13 Comparación de las rutas metabólicas para el metabolismo de glucosa entre bacterias homolácticas, heterolácticas y bifidobacterias. 60

14 Valores de $k_L a$ a diferentes flujos de aireación. Pruebas realizadas en medio de cultivo TPYG sin células. 61

15 Absorción de oxígeno a diferentes flujos de aireación. Pruebas realizadas en medio de cultivo TPYG sin células. 62

A.1 Composición del perfil de UFC/ml contra absorbancia 76

A.2 Perfiles de pH en condición anaerobia y aireadas 77

TABLAS

No.	Titulo	Pag
1	Especies de bifidobacterias y su origen	10
2	Diversos sistemas utilizados para lograr ambiente anaerobio	24
3	Comparación de parámetros de las fermentaciones utilizando ambiente con nitrógeno o con CO_2	37
4	Concentraciones de biomasa, rendimientos molares de biomasa y tasa específica de asimilación de oxígeno durante las fermentaciones anaeróbicas y aireadas con *B. infantis* en medio TPYG a 37° C	47
5	Comparación de la tasa específica de consumo de oxígeno en diferentes microorganismos	48
6	Concentración de metabolitos y rendimientos de productos a las 12 h, para fermentaciones anaeróbicas y aireadas en medio TPYG a 37° C	52
7	Balance de Carbono	55

RESUMEN

Se desarrollaron las condiciones de fermentación para permitir que *Bifidobacterium infantis* creciera en la presencia de aire. Así mismo, se analizaron una serie de fermentaciones en lote en medio TPYG, comenzando desde condiciones anóxicas hasta la aplicación de flujos de aire bajos [desde 0.02 hasta 0.1 volumen de aire, por volumen de medio por minuto (vvm)]. Los parámetros analizados fueron crecimiento, tasa de consumo de oxígeno y la formación de los productos principales del metabolismo de glucosa (Acetato, lactato y formato) en este microorganismo. Bajo todas las condiciones de aireación, *B. Infantis* mostró una alta tolerancia al oxígeno, con una tasa máxima de consumo de oxígeno de 0.34 mmol de O_2 por gramo de peso seco por hora en presencia de 0.06 vvm. Se obtuvieron rendimientos celulares similares bajo las condiciones anaerobias y aireadas (0.11-0.13 y 0.11 gramos de peso seco por mmol de glucosa, respectivamente). El oxígeno también influyó en la formación de metabolitos, ya que la producción de lactato y su relación molar a acetato aumentó y el formato disminuyó al aumentar la tasa de aireación. Bajo condiciones anóxicas, se obtuvo una concentración máxima de 8.1 mM de lactato y una relación acetato/lactato de 3.5/1 , mientras que en condiciones aireadas la concentración de lactato aumentó más de dos veces y la relación molar acetato/lactato disminuyó a 1.5/1. Se demostró la posibilidad de balancear la relación molar acetato/lactato para propósitos organolépticos así como el poder obtener buen crecimiento bajo condiciones de micro aireación.

ABSTRACT

Fermentation conditions were developed to allow *Bifidobacterium infantis*, a strict anaerobe, to grow in the presence of air. Batch fermentations in TPYG medium, starting from anaerobic conditions followed by the application of low air flow rates (from 0.02 to 0.1 vvm), were analyzed for growth; oxygen uptake and product formation. Under all aerated fermentations *B. infantis* presented high aerotolerance with a maximum oxygen specific consumption rate of 0.34 mM of O_2 g^{-1} h^{-1} at the 0.06 vvm condition. Similar growth yields were obtained under aerobic (0.11-0.13 g mM^{-1}) and anaerobic conditions (0.11 g mM^{-1}). Oxygen also influenced metabolite formation since lactate production was increased (18.3 mM of lactate produced with 0.06 vvm, in contrast to 8.1 mM for the anaerobic condition, acetate:lactate molar ratios were of 1.5:1 and 3.4:1 respectively); and formate production was inhibited. The possibility of balancing acetate:lactate molar ratios for organoleptic purposes as well as obtaining good growth under microaerated conditions was demonstrated.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Las bifidobacterias son bacterias gram positivas que habitan el tracto gastrointestinal tanto de humanos como de animales y son utilizadas comúnmente en la preparación de productos probióticos (Beskorovainy y Miller-Catchpole 1989). La ingestión oral de estos microorganismos produce un efecto protector en la flora intestinal.

La especie *Bifidobacterium infantis* es una cepa del tracto gastrointestinal de origen infantil que experimentalmente se ha demostrado que participa en la exclusión competitiva en contra de bacterias generadoras de diarreas (Bernet y col. 1993). Las enfermedades diarreicas están entre las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en México (Secretaria de Salud 2001), por lo que la fabricación de productos probióticos con esta especie en particular es de gran interés.

Uno de los aspectos tecnológicos a ser considerados en la selección de cepas probióticas es la viabilidad de los microorganismos durante el procesamiento (Mattila-Sandholm y col., 2002), y entre los factores que afectan significativamente la viabilidad de las bifidobacterias está el oxígeno. Las especies del género *Bifidobacterium* han sido aplicadas en la manufactura de productos lácteos y farmacéuticos sin embargo, son consideradas anaerobias estrictas ya que no poseen cadena respiratoria ni la enzima catalasa, de ahí que la toxicidad por oxígeno es un problema importante cuando se cultivan a estos microorganismos para aplicaciones industriales. Sin embargo, algunas cepas son consideradas aerotolerantes moderadas, ya que sobreviven en presencia de aire (De Vries y Stouthamer, 1969; Uesugi y Yamija, 1978; Meile y cols., 1997; Beerens y col., 2000; Talwalkar y Kailasapathy, 2001). Shimamura y col., (1990, 1992) demostraron que *B. infantis*, *B. breve*, *B longum* y *B. adolescentis* son capaces de consumir oxígeno y encontraron que estas cepas tienen actividades NADH oxidasa, NADH peroxidasa y

actividad baja de superóxido dismutasa; estas actividades pueden minimizar la toxicidad de compuestos activados derivados del oxígeno. Estas enzimas también operan en las bacterias ácido lácticas, la cuales son consideradas anaerobios facultativos, aunque algunas de estas cepas son capaces de crecer bien bajo condiciones de aireación. Esta habilidad ha sido relacionada a un cambio en el metabolismo de carbohidratos en respuesta al oxígeno (Condon, 1987). En un estudio reciente, Talwalkar y Kailasapathy (2003), encontraron un cambio en la respuesta metabólica de cuatro especies de *Bifidobacterium* a diferentes ambientes de oxígeno, entre ellos que la relación lactato a acetato disminuía al ir aumentando el porcentaje de oxígeno en el ambiente. Se puede concluir a partir de los estudios anteriores que la aerotolerancia es diferente para cada cepa de bifidobacterias; por lo mismo se considera necesario probar la resistencia al oxígeno del microorganismo probiótico de forma particular e investigar si esta resistencia está acoplada a un cambio en el metabolismo de carbohidratos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del oxígeno en el crecimiento y la formación de los principales productos finales del metabolismo de glucosa en *B. infantis*.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 Probióticos

La microbiota intestinal tiene un fuerte efecto en el estado de salud de hombres y animales. La importancia de las bacterias lácticas en la biota intestinal para la salud humana y la longevidad fue señalada primero por Metchnikoff al principio del siglo 20. Desde entonces, especialmente durante la última década se han hecho intentos por mejorar el estado de salud al modular la biota intestinal autóctona por medio de aditivos microbianos vivos: los probióticos. Aunque existen muchas definiciones propuestas para describir a los probióticos, una de las utilizadas más frecuentemente es la de Havenaar y col., (1992). En esta definición, los probióticos se definen como monocultivos o cultivos mixtos de micro-organismos vivos los cuales cuando se aplican a animales o al hombre, afectan benéficamente al huésped mejorando las propiedades de la microbiota autóctona (Gismondo y col., 1999).

Los probióticos, usualmente, están compuestos de una o varias cepas de una sola especie o de una mezcla de varias especies, éstos microorganismos son componentes comunes de la biota intestinal normal y han sido aislados a partir de las heces de humanos saludables. La relación entre la microflora intestinal y el huésped es tan específica, que cualquier alteración en el balance de los organismos puede resultar en enfermedad. Los desórdenes gastrointestinales de etiología infectiva son endémicos y constituyen un problema de salud serio, especialmente en países en desarrollo. La manifestación principal de las infecciones entéricas es la diarrea, la cual es responsable de una morbilidad muy alta.

El aumento de la resistencia a los antibióticos ha renovado el interés en el uso de los probióticos tanto por médicos como por científicos, eso ha conducido al descubrimiento de algunos microorganismos capaces de proteger el tracto gastrointestinal de la invasión de

bacterias patógenas u oportunistas. El uso del término probiótico para describir un suplemento alimenticio específicamente diseñado para mejorar la salud, data de 1974 cuando Parker lo utilizó para describir a los suplementos alimenticios que promovían el crecimiento en animales (Gismondo, 1999).

Fuller (1992) redefinió a los probióticos como "un suplemento alimenticio de origen microbiano que afecta benéficamente al huésped, mejorando su balance o equilibrio intestinal. Esta definición restringe a los probióticos a los organismos viables solamente. Las cepas bacterianas que se utilizan con mayor frecuencia son: *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium cereus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Los criterios de selección deben estar relacionados con el impacto de éstos en la salud y bienestar de las personas y/o animales a los que van a ser dirigidos. Se han establecido ciertos criterios clave, para definir bacterias con capacidad probiótica óptima (Havenaar y col. 1992); estos pueden ser divididos en tres categorías principales:

1°. Criterio Microbiológico

- El organismo debe ser seguro, es decir no patógeno
- Debe sobrevivir a los ataques iniciales del sistema de defensa del huésped (saliva, jugos gástricos y biliares)
- Debe ser de origen humano
- Genéticamente estable

2°. Aspectos Tecnológicos

- Susceptible de cultivarse a escala industrial
- Buenas propiedades sensoriales, es decir, que se logre un producto aceptable, en cuanto a sabor, aroma, etc.
- Sobrevivencia a valores bajos de pH
- Resistencia a fagos
- Viabilidad durante el procesamiento
- Estabilidad en el producto durante su almacenamiento

Otros problemas tecnológicos a considerar:

- El ambiente del alimento puede ser muy diferente del ambiente dentro del tracto-gastrointestinal, por lo que el microorganismo puede no resultar adecuado para la elaboración de un producto probiótico en particular.
- La tasa de crecimiento puede ser muy baja y se podrían estar generando sabores no deseados.
- La viabilidad puede verse afectada.

3° Ejercer efectos funcionales

- Adherencia a las superficies epiteliales y persistencia en el tracto gastro-intestinal de las personas con el fin de interferir con la adherencia o activación de patógenos en el intestino.
- Que posean efectos inmuno-estimulatorios
- Que posean actividades antagónicas contra patógenos
- Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas

Algunos de los efectos benéficos de probióticos detectados en varias pruebas clínicas son:

- Modulación de la flora intestinal
- Modulación de la respuesta inmune
- Disminución de actividades enzimáticas fecales.
- Aumento en el contenido de ácidos grasos en heces
- Mejoramiento de la constipación intestinal
- Alivio en síntomas de dermatitis atópica en niños
- Reducción, prevención o tratamiento de varias enfermedades diarreicas
- Efectos positivos en el cáncer de vejiga y cervical

Fuente: Mattila-Sandholm y col., 2002.

2.2 El género *Bifidobacterium*

Las bifidobacterias son bacilos, (Figura 1) gram positivos, anaerobios estrictos no esporulados, que presentan características pleomórficas muy específicas en función de su edad y de las condiciones de cultivo (Poupard y col., 1973).

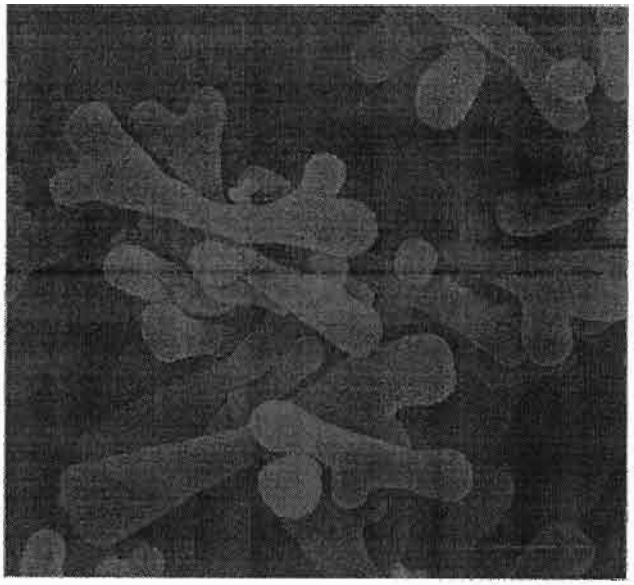

Fig. 1. Fotografía electrónica de bifidobacterias.

En las primeras etapas de su estudios se les agrupó en el género de *Lactobacillus*, sin embargo a partir de 1965 comenzaron a surgir hallazgos en estudios metabólicos, serológicos y de contenido de guanina y citocina que llevaron a reubicarlas en un género independiente (Scardovi y Trovatelli, 1965).

Estos microorganismos son habitantes normales del intestino humano, se adquieren durante el nacimiento en forma natural, aunque también se presentan en otras especies animales. Actualmente se han identificado 31 especies diferentes de bifidobacterias, de las cuales 12 son de origen humano (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de bifidobacterias y su origen

ESPECIE	FUENTE DE AISLAMIENTO
B. adolescentis	Intestino de adulto
B. angulatum	Heces de humano adulto
B. animalis	Heces de rata
B. asteroides	Abeja (Apis mellifera)
B. bifidum	Heces de humano infante
B. boum	Rumen de bovino
B. breve	Heces de humano infante
B. catenulatum	Heces de humano adulto
B. choerinum	Heces de cerdo
B. coryneforme	abeja (Apis mellifera)
B. cuniculi	Heces de conejo
B. denticolens	Caries dental humana
B. dentium	Caries dental humana
B. gallicum	Heces de humanos
B. gallinarum	Cecum de pollo
B. globosum	Rumen de bovino
B. indicum	Abeja (Apis cerana)
B. infantis	Heces de humano infante
B. inopinatum	Caries dental humana
B. lactis	Leche fermentada

B. longum	Heces de humano adulto
B. magnum	Heces de conejo
B. merycicum	Rumen de bovino
B. minimum	Aguas negras
B. pseudocatenulatum	Heces de humano infante
B. pseudolongum	Heces de cerdo
B. psychracrophilum	Heces de cerdo
B. pullorum	Heces de pollo
B. ruminantium	Rumen de bovino
B. saeculare	Heces de conejo
B. scardovii	Heces de adulto
B. subtile	Aguas negras
B. suis	Heces de cerdo
B. thermacidophilum	Digestor anaerobio
B. thermophilum	Heces de lechón
B. thermacidophilum ssp. Porcinum	Heces de lechón

FUENTE: Crociani, y col., 1996, y modificado con Leahy y col., 2005.

Las bifidobacterias constituyen un grupo de microorganismos con características metabólicas muy particulares, a diferencia de los lactobacilos y otras bacterias lácticas la vía de degradación de glucosa es a través de una ruta alterna donde la enzima clave es fructosa-6-fosfato-fosfocetolasa (F6PPK) (Figura 2). En esta vía los principales productos de fermentación son acetato y lactato en una relación 3:2 para 2 moles de glucosa y es muy

característica para este grupo de microorganismos, por lo que la detección de esta enzima se utiliza para identificar a las bifidobacterias a nivel genérico.

En esta vía, la glucosa es convertida a fructosa-6-fosfato por la acción de la hexocinasa y la glucosa-6-fosfato isomerasa. La enzima fructosa-6-fosfato-fosfocetolasa rompe a la fructosa-6-fosfato para dar eritrosa-4-fosfato y acetil-fosfato. La formación de ácido acético a partir de acetil-fosfato es catalizada por la enzima acetato cinasa.

La eritrosa-4-fosfato y la fructosa-6-fosfato son convertidas a 2 moles de pentosa-fosfato por la acción de las enzimas transaldolasa y transcetolasa. La enzima xilulosa-5-fosfato-fosfocetolasa corta dos moles de xilulosa-5-fosfato para dar 2 moles tanto de acetil-fosfato como de 6-gliceraldehido-3-fosfato. A partir de acetil-fosfato se forma ácido acético y el gliceraldehido-3-fosfato es convertido a ácido pirúvico a través de las reacciones de la glucólisis. El ácido pirúvico es reducido a L(+)-ácido láctico por la acción de la LDH.

El rendimiento de ATP, es de 2.5 moles de ATP por mol de glucosa. En las vías homofermentativa y heterofermentativa, los rendimientos de ATP son de 2 ATP por mol de glucosa y un ATP por mol de glucosa respectivamente (Rasic y Kurman, 1983).

DOCUMENTO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

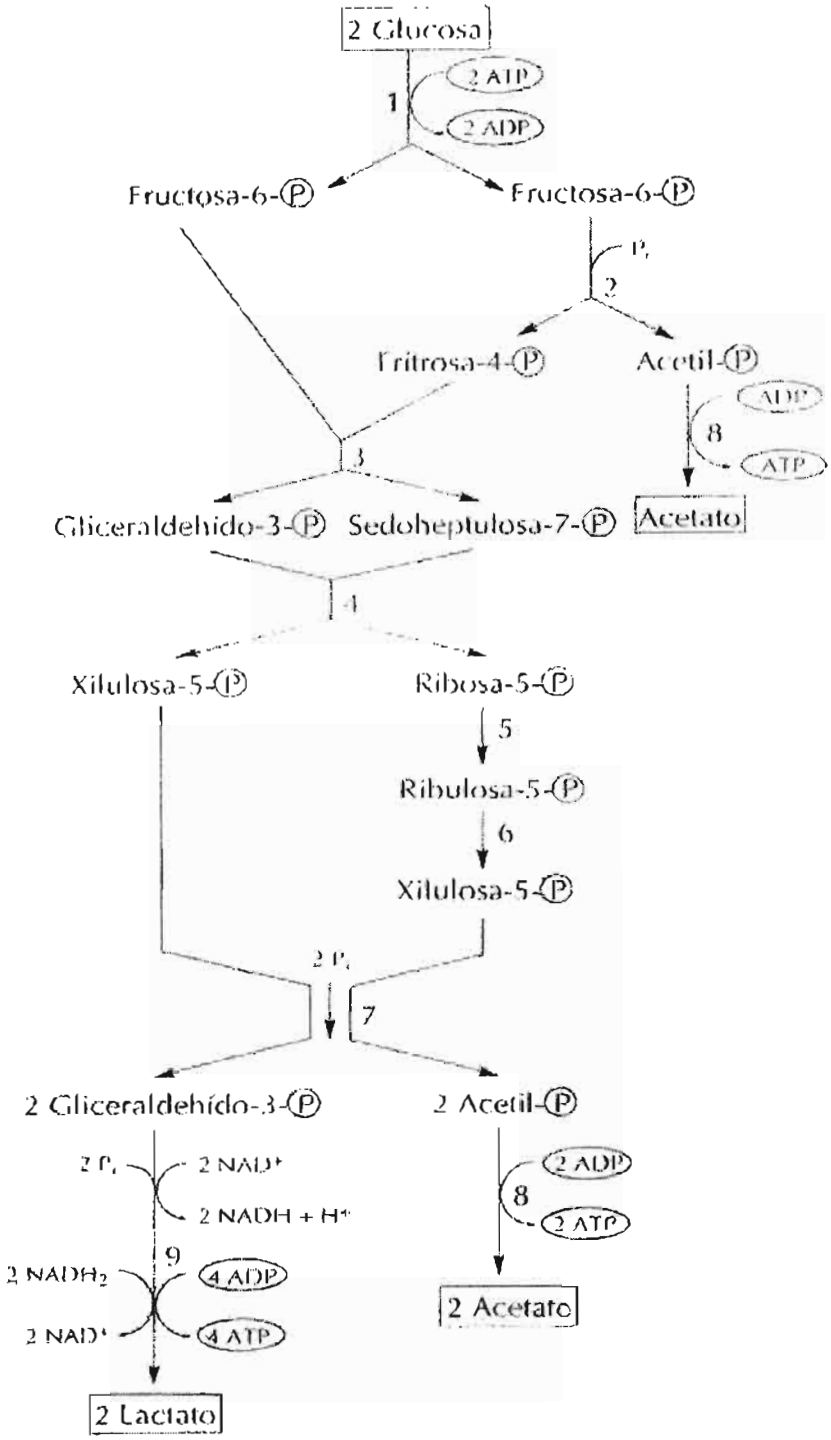

Fig. 2.- Metabolismo de glucosa por la vía de la fructosa 6 fosfato fosfocetolasa por *Bifidobacterium*. 1, hexocinasa y glucosa 6 fosfato isomerasa; 2, fructosa-6-fosfato fosfocetolasa; 3, transaldolasa; 4 transcetolasa; 5, ribosa-5 fosfato isomerasa; 6, ribulosa-5-fosfato 3 epimerasa; 7, xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa; 8, acetato cinasa; 9, enzimas como en la vía homofermentativa (Parés y Juárez, 2002).

La mayoría de las cepas de bifidobacterias, sin embargo, producen más ácido acético y menos ácido láctico de lo esperado por la vía de la fructosa-6-fosfato. El exceso de ácido acético es el resultado de la partición fosforoclástica de una parte del ácido pirúvico a los ácidos acético y fórmico, y una reducción subsiguiente de algo de ácido acético a etanol. El exceso de ácido acético es formado principalmente en la fase logarítmica de crecimiento. La proporción de los productos de fermentación varia considerablemente entre las diferentes cepas (De Vries y Stouthamer, 1968; Lauer y Kandler, 1976). En la mayoría de las cepas ambas rutas están involucradas en la conversión de ácido pirúvico.

El medio de cultivo que se utilice para el crecimiento de las bifidobacterias también puede influir en la proporción en la que se va a llevar a cabo el rompimiento del ácido pirúvico por la vía fosforoclástica. Por ejemplo, en la fermentación de lactosa, se produce más ácido láctico por mol de lactosa que la producida a partir de 2 moles de glucosa o galactosa. La fermentación de galactosa es parecida a la de glucosa, mientras que en la fermentación de manitol se forma más etanol que cuando se el microorganismo utiliza a la glucosa. (De Vries y Stouthamer, 1968). Degnan y Macfarlane (1994), encontraron que la distribución de los productos de fermentación depende de la disponibilidad de glucosa. Ellos investigaron la producción de metabolitos en condiciones limitantes y de exceso de glucosa. En los cultivos limitados de glucosa los principales productos finales del metabolismo fueron acetato y formato, en estas condiciones no detectaron lactato. En las condiciones en las que utilizaron un exceso de glucosa, se produjeron principalmente lactato y acetato y el formato no fue producido. La vía alterna para el metabolismo de glucosa en bifidobacterias se muestra en la Figura 3.

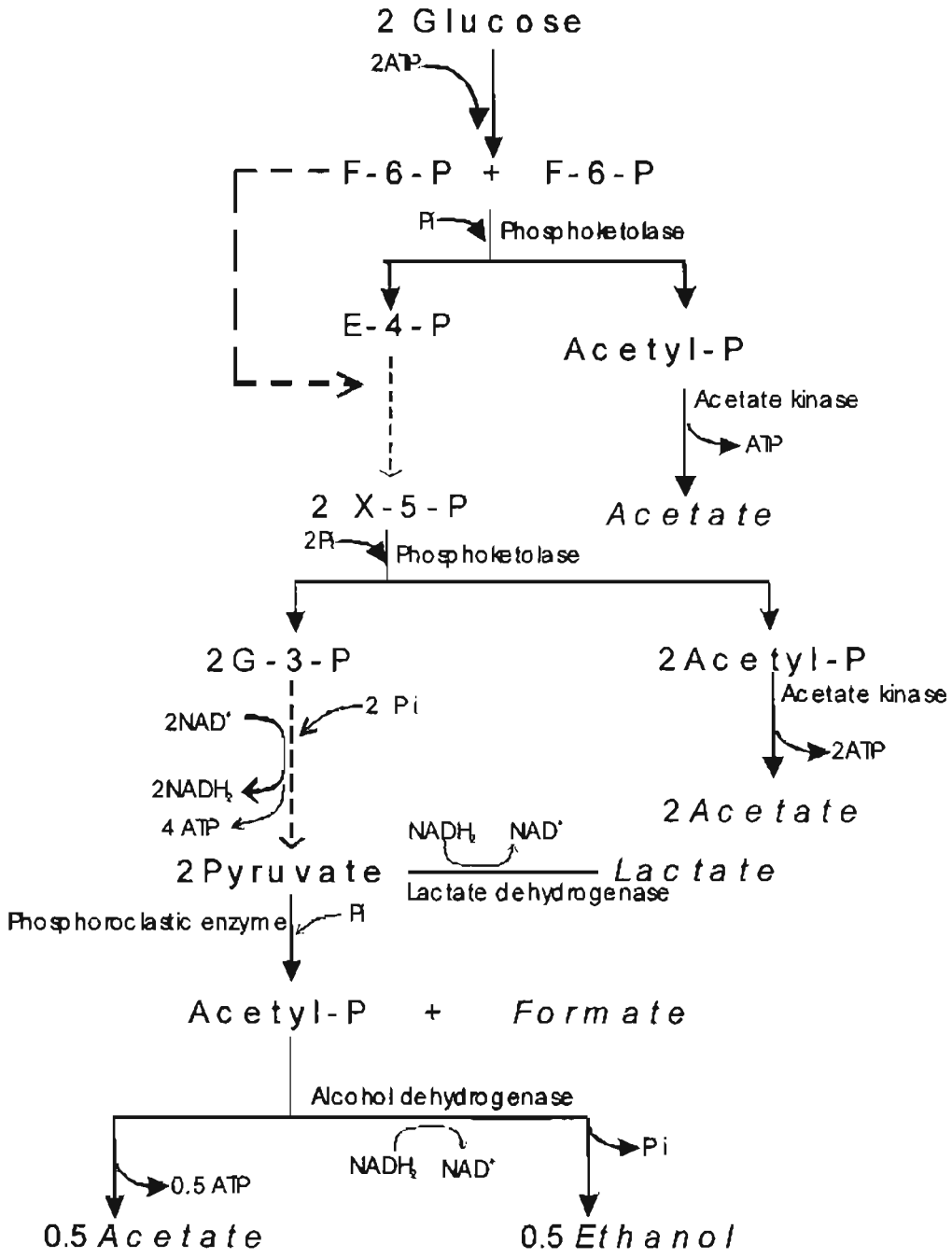

Fig. 3 Esquema simplificado del metabolismo de glucosa y ruta alternativa de la utilización del piruvato en bifidobacterias. F-6-P, fructosa-6-fosfato; X-5-P, xilulosa-5-fosfato; E-4-P, eritrosa-4-fosfato; G-3-P, gliceraldehido-3-fosfato; Pi, fosfato inorgánico. (Degnan y Macfarlane,1994)

2.3 *Bifidobacterium* como probiótico:

2.3.1 Bifidobacterias y sus efectos benéficos en la salud humana.

Existen diferentes funciones probióticas que han sido atribuidas a las bifidobacterias, a continuación se presenta la recopilación de información sobre las mismas.

2.3.1.1 Interferencia bacteriana.

Las bifidobacterias producen ácidos como productos finales metabólicos (acetato y lactato). Estos disminuyen el pH del medio y pueden así ejercer un efecto antibacteriano. Algunos estudios indican que las bifidobacterias son capaces de excretar un producto metabólico que es directamente inhibitorio hacia varias bacterias patógenas tanto gram-positivas como gram-negativas (Gibson and Roberfroid, 1995). Otros productos que provocan la inhibición de otros microorganismos y que son producidos por bifidobacterias son el peróxido y algunas bacteriocinas.

Otra forma de interferencia bacteriana se da por competencia en sitios de adhesión en el intestino, se considera conveniente que las cepas consideradas como probióticos, se implanten en la mucosa de las paredes intestinales interaccionando con las células de ésta. Bernet y col., (1993) reportan la adhesión de células de *B. breve* y *B. infantis* a células de colon (línea celular Caco-2) *in vitro*. Ellos encuentran que estas cepas al igual que *L. casei* interaccionan con la superficie de la mucosa de las células Caco-2 y que es un factor proteínico que sintetizan el que ayuda a la adhesión a la superficie celular, así mismo estas proteínas muestran un efecto inhibitorio de la adhesión celular de cepas enterotoxigénicas y enteropatógenas.

Se han llevado a cabo experimentos en donde se retan un microorganismo probiótico y una cepa patógena, entre los resultados obtenidos se ha encontrado cierto éxito con *B. longum vs. Salmonella typhimurium*, *B. breve* y *B. pseudocatenulatum vs. E. coli* O157:H7, diferentes especies de bifidobacterias *vs. Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Bacteroides vulgatus* (Leahy y col., 2005).

2.3.1.2 Producción de vitaminas.

Las bifidobacterias producen vitaminas, principalmente del grupo B, así como enzimas digestivas como la caseína fosfatasa y lisozima.

Una aportación importante de los bífidos en el huésped es la síntesis de vitaminas, principalmente del complejo B, y una que aportan importante es la vitamina B_{12}, la piridoxina y el ácido fólico donde todas las cepas estudiadas la producen, no así tiamina y ácido nicotínico. (Bezkorovainy y Miller-Catchpole, 1989). Aunque estos estudios han sido *in vitro*, la aportación de estas vitaminas en los vehículos para aportar bifidobacterias son benéficos para el huésped.

Krause y col., (1996) encontraron una correlación entre la densidad de población de bifidobacterias en ciego y colon y las concentraciones de ácido fólico determinadas en plasma, ciego y colon en ratas. El aumento en la población de bifidobacterias fue provocado al alimentar a las ratas con una dieta en la que incluían sólidos de leche humana.

2.3.1.3 Efectos inmuno-modulatorios y actividad antitumoral.

Ciertos componentes celulares de las bifidobacterias actúan como inmuno-moduladores, es decir, promueven la respuesta inmunológica en contra de células malignas. Esta activación del sistema inmune también contribuye hacia la resistencia del huésped a

los patógenos. Algunos ejemplos recientes son los estudios realizados por Yasui y col., (1995). Ellos utilizaron una cepa de *B. breve* (YIT4064) aislada de heces humanas y previamente identificada entre varias cepas de bifidobacterias como inductora de grandes cantidades de anticuerpos IgA; se investigó si la administración de esta cepa aumentaba la producción de IgA anti-rotavirus SA-11 en la glándula mamaria de ratones y si las crías que recibían su leche eran protegidas en contra del rotavirus ingerido. Este estudio mostró que el 78.3% de las crías nacidas y alimentadas por las hembras inmunizadas oralmente con una única dosis de 10^6 pfu de SA-11 fueron protegidas en contra de la gastroenteritis inducida; la administración oral de *B. breve* aumentó la protección aproximadamente al 100%, mostrando que *B.breve* tuvo una actividad adyuvante.

Sanders (1993) sugiere que la evidencia más fuerte de que existe un efecto de las bifidobacterias en el huésped es la modulación de las actividades enzimáticas de las poblaciones bacterianas del colon, las cuales a su vez podrían estar asociadas con enfermedades o promoción de tumores. Por ejemplo, la incidencia en el cáncer de colon fue más baja cuando la población de bifidobacterias del colon fue más alto y la población de *Clostridium perfringens* fue más baja. En algunos estudios se mostró que la administración de bifidobacterias o lactobacilos a animales disminuyeron los tumores o los folículos aberrantes del colon, éstos últimos son supuestamente lesiones precancerosas.

Fabrice y col., (1997) encontraron, al incluir en la dieta de ratones, fructo-oligosacáridos de cadena corta que redujeron significativamente el número de tumores en colon con respecto al grupo control alimentados con una dieta basal sin fructo-oligosacáridos. Sus experimentos mostraron que el consumo de fructo-oligosacáridos de cadena corta contrarresta la carcinogénesis del colon en etapas avanzadas., posiblemente a través de la estimulación de la inmunidad antitumoral al modular el ecosistema colónico. El

hecho de que este efecto protector fue obtenido en el colon y no en el intestino delgado sugiere que los eventos se llevaron a cabo específicamente en el colon, debido aparentemente a una estimulación sobre la población de bifidobacterias.

2.3.1.4 Disminución de disturbios intestinales.

Estas bacterias también han sido usadas para restablecer la flora intestinal normal durante la terapia con antibióticos Los ejemplos en la literatura los revisó Elmer y col., en 1996. Los casos en los que se utilizaron bifidobacterias fueron: un estudio administrando a voluntarios yogurt elaborado con *B. longum*, en el que se obtuvieron resultados positivos en cuanto a que se redujo la diarrea a los voluntarios que estaban tomando eritromicina. En otro estudio en el que se utilizó *B. longum* junto con *Lactobacillus acidophilus* se utilizó una leche fermentada con 10 voluntarios que se encontraban tomando clindamicina, en los resultados obtenidos se observó una disminución de malestar estomacal.

Saavedra y col., (1994) utilizaron en un ensayo controlado una fórmula infantil suplementada con *B. bifidum* y *Streptococcus thermophilus*. Esta fórmula fue dada a infantes de entre 5-24 meses que fueron internados por diarrea. Los resultados del uso de este probiótico fueron que puede reducir la incidencia de la diarrea aguda e incluso eliminar al rotavirus que la provoca.

2.3.1.5 Mejoramiento en la digestión de lactosa.

Las personas intolerantes a la lactosa sufren de diarrea o dolores abdominales y presentan flatulencia excesiva después de ingerir leche. Sin embargo, toleran muy bien productos lácteos fermentados, aun cuando éstos contienen lactosa. Passerat y col., (1995) realizaron un ensayo *in vitro* en el que estudiaron la actividad de lactasa real de *B. bifidum*

2.3.1.7 Desconjugación de ácidos biliares.

Grill (1995a) estudió el efecto de seis sales biliares diferentes en el crecimiento de ocho cepas de bifidobacterias. Se presentó un efecto inhibitorio del crecimiento muy fuerte para cada sal y cepa. Este fenómeno se explicó por la producción de sales biliares desconjugadas durante el crecimiento de las bifidobacterias. El fenómeno de la desconjugación fue congruente con la producción de biomasa, y las sales biliares desconjugadas fueron el único compuesto producido durante la biotransformación de los bífidos. En los experimentos realizados en células en reposo, se presentaron diferencias entre las cepas y el tipo de sal biliar, particularmente en lo que se refiere al ácido taurocólico. Las cepas de *Bifidobacterium longum* fueron las más eficientes entre las bacterias probadas. Posteriormente Grill y col., (1995b) purificaron y caracterizaron la enzima hidrolasa de sales biliares conjugadas que cataliza la hidrólisis del enlace amido que conjuga los ácidos biliares a glicina o taurina. Esta enzima se purificó de *B. longum* BB536 y la eficiencia enzimática que se observó fue más alta que para otros géneros con los que se comparó.

2.4 Anaerobiosis estricta, anaerobiosis facultativa, microaerofilia y aerotolerancia.

Las bacterias se pueden dividir en cuatro grupos principales con base en sus respuestas al oxígeno molecular:

1. Bacterias aeróbias estrictas.- Son aquellas que requieren presencia de oxígeno
2. Bacterias microaerofílicas, crecen mejor en concentraciones de oxígeno menores a las del aire.
3. Bacterias anaeróbias facultativas, crecen en presencia o ausencia de oxígeno (en presencia de oxígeno, respiran y en ausencia de oxígeno, fermentan).

midiendo la desaparición de lactosa. El pH óptimo para esta actividad enzimática resultó de 6.5. Jiang y col., (1996) realizaron un estudio al azar en que se evaluaron los efectos del consumo de leche no fermentada conteniendo cepas diferentes de *B. longum* sobre la digestión de lactosa. Se demostró que el mejoramiento de la digestión de lactosa por *B. longum* depende de la cepa utilizada y del sustrato en el que fue crecida. Las diferencias que encontraron en la digestión de lactosa entre las cepas probadas correlacionaban con las diferencias en las actividades de β-galactosidasa, así como en la velocidad de transporte del azúcar que presentaba cada cepa. Estos mismos investigadores encontraron que un factor que puede afectar la actividad de β-galactosidasa en el tracto intestinal es la sensibilidad a las sales biliares por lo que es conveniente utilizar cepas que sean tolerantes a estas sales.

2.3.1.6 Disminución de colesterol en suero.

Se han llevado a cabo ensayos en los que se menciona una disminución de colesterol en suero durante el consumo de dosis muy grandes de productos lácteos fermentados. Tahri y col., (1996) investigaron la remoción de colesterol en un ensayo *in vitro* y si las cepas de bifidobacterias utilizadas realmente lo asimilaron Los resultados mostraron que las cepas de bifidobacterias cultivadas en presencia de colesterol marcado o esterificado fueron capaces de asimilar el mismo, se concluyó que la remoción del colesterol del medio de cultivo se debe tanto a la asimilación por los bífidos como a la precipitación del colesterol debido a la disminución del pH.

4. Bacterias anaeróbias estrictas, estas no pueden crecer en presencia de oxígeno.

Dentro de cada una de estas categorías existen rangos de sensibilidad y requerimiento al oxígeno. Para un crecimiento normal, los microorganismos aeróbios, requieren de oxígeno molecular a una concentración cercana a la atmosférica (21% v/v) mientras que los anaerobios varían en su respuesta al oxígeno, yendo desde los extremadamente sensibles como los metanógenos, hasta los más aerotolerantes como *Desulfovibrio*, un organismo sulfato-reductor, el cual incluso algunas de sus especies pueden ser microaerofilicas. (Jenney y col., 1999). Otros ejemplos de éstos, son los del género *Clostridium* (Se encuentran en suelo, sedimentos de lagos, tracto intestinal, alimentos enlatados, donde no hay oxígeno), *Methanobacterium* (útil en degradación de aguas residuales), y *Ruminococcus* (habitantes del rumen). Otros pueden ser aerotolerantes, es decir, sobreviven y crecen en la presencia de pequeñas cantidades de oxígeno, aunque no utilizan el oxígeno en su metabolismo (Lim 1998).

Las bacterias tienen enzimas que convierten al oxígeno en diferentes compuestos químicos. La reducción química y metabólica del oxígeno, resulta en la producción de moléculas altamente reactivas y tóxicas. El producto de la reducción univalente del oxígeno es el anión superóxido (O_2^-); este es el precursor en la formación de peróxido de hidrógeno, además puede reaccionar con el mismo peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición para producir el radical hidroxilo (OH^-), (Jenney y col., 1999). En general todos estos compuestos pueden causar oxidación de los componentes celulares y ser letales para la célula. La mayoría de las bacterias aerobias, microaerofilicas y facultativas poseen enzimas que convierten estas sustancias tóxicas en compuestos inofensivos. Los radicales libres superóxido son convertidos en oxígeno y peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (SOD):

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

Subsecuentemente el peróxido de hidrógeno se descompone en oxígeno y agua por la enzima catalasa, o es reducido a agua por una peroxidasa:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow 2H_2O + NAD^+$$

Los anaerobios aerotolerantes poseen superóxido dismutasa, pero carecen de catalasa para degradar el peróxido de hidrógeno. La mayoría de los anaerobios obligados estudiados a la fecha, carecen tanto de superóxido dismutasa como de catalasa de ahí que los anaerobios obligados son incapaces de degradar el peróxido de hidrógeno.

Existen varias formas de lograr condiciones anaerobias en los cultivos. El oxígeno en un contenedor sellado, puede ser desplazado con otro gas, tal como nitrógeno, hidrógeno, argón o bióxido de carbono. Otra forma utilizada comúnmente es el sistema anaerobio Gas Pak, que consiste en el uso de una jarra sellada como contenedor, donde se genera hidrógeno al adicionar agua a un sobre que contiene borohidruro de sodio y bicarbonato de sodio. El hidrógeno reacciona con el oxígeno disponible en la presencia de un catalizador, como el paladio para formar agua: $2H_2 + O_2 \longrightarrow 2H_2O$. El resultado es una atmósfera anaerobia. Así mismo, el contenido de oxígeno del medio líquido se puede disminuir al adicionar agentes reductores (por ejemplo, tioglicolato de sodio, cisteína o sulfuro ferroso). Estos pueden remover cualquier cantidad de oxígeno disponible del ambiente, al reducirlo a agua (Lim, 1998).

En la Tabla 2 se muestran diversos ambientes anaerobios que se han utilizado para bifidobacterias y otras bacterias.

Tabla 2 Diversos sistemas utilizados para lograr ambiente anaerobio

Microorganismo	Ambiente anaerobio	Referencia
Bifidobacterium. bifidum *B. longum* *B. adolescentis* *B. pseudolongum* *B. thermophilum* *B. animalis*	N_2	Lauer y Kandler, 1976
B. inopinatum *B. denticolens*	N_2 CO_2 10% en N_2 CO_2 10% en aire	Crociani y col., 1996
Lactococcus lactis	Argón estéril	Neves y col., 2002
B. adolescentis *B. angulatum* *B. bifidum* *B. breve* *B. catenulatum* *B. infantis* *B. longum* *B. pseudocatenulatum*	Sistema Gas Pak 90% H_2/10% CO_2	Chevalier P., y col., 1990
Cepas de género *Bifidobacterium*	Jarra anaeróbica N_2 + CO_2 (95:5)	De Vries y Stouthamer, 1968.
Bacterias lácticas del género *Lactobacillus*	Gas N_2	Sakamoto y Komagata, 1996
Streptococcus pyogenes	Oxyrase (Membranas de *E. Coli*)	King y col., 2000.
Bacteroides fragilis	Cámara anaerobia N_2- CO_2 e H_2 (80:10:10)	Baughn y Malamy, 2004
Clostridium Homopropionicum *C. neopropionicum* *Propionibacterium freudenreichii* *Veiollonella parvula* *Pelobacter propionicus*	N_2- CO_2 (80:20)	Seeliger y col., 2002
Lactobacillus sake	N_2- CO_2 (90:10)	Amanatidou y col., 2001
Bacterias homoacetogénicas: Sporomusa termitida, Acetonema longum y Acetobacterium woodii	N_2- CO_2 (80:20)	Boga y Brune, 2003

2.5 Tolerancia al oxígeno en bifidobacterias.

Los productos lácteos que incluyen células viables de especies de *Bifidobacterium* se han explotado desde hace mucho tiempo sobre todo en Japón, sin embargo los fabricantes se encuentran con algunas dificultades. Una de las principales es el hecho de que estos microorganismos son anaerobios obligados, y se requiere tomar ciertas precauciones para prevenir los efectos tóxicos del oxígeno cuando se cultiva a estas bacterias para aplicaciones industriales. Las bifidobacterias presentan características tecnológicas un poco más complicadas que los procesos con otras bacterias lácticas, ya que su crecimiento se presenta en ausencia de oxígeno, y sus tiempos de generación son mayores que otros cultivos lácticos, lo que encarece su costo de producción (Corre y Boyaval, 1992). Durante la producción de yogurt el oxígeno se disuelve en la leche, aunque no es imposible evitar el efecto del oxígeno, para lograrlo se requiere de equipo que resulta costoso. El prevenir la toxicidad del oxígeno hacia estos microorganismos es especialmente crucial durante la producción y procesamiento de la biomasa celular y también es importante asegurar la viabilidad durante el almacenamiento de los productos lácteos (Shimamura y col., 1992). Esto ha llevado a algunos investigadores ha estudiar la susceptibilidad de estos microorganismos al oxígeno con el fin de utilizar condiciones que minimicen la influencia del oxígeno en los alimentos procesados que contengan bifidobacterias.

De Vries y Stouthamer (1969), fueron los primeros que estudiaron el grado de sensibilidad al oxígeno de doce cepas de *Bifidobacterium*. Midieron el tamaño de zonas de inhibición producidas cuando las bacterias fueron crecidas en presencia de aire. Los tamaños de las zonas de inhibición de las diferentes especies variaron de 1 a 23mm, lo que indicó que las cepas de *Bifidobacterium* tienen una susceptibilidad diferente al oxígeno. En

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

algunas de las cepas se encontraron concentraciones de H_2O_2 acumuladas, lo que indicaba que eran capaces de asimilar oxígeno. Posteriormente en 1990 Shimamura y col., detectaron asimilación de oxígeno en *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis* y *B. longum*, utilizando como sustratos piruvato, malato, alanina y NADH; obteniendo actividad únicamente al utilizar el NADH, lo que indica claramente que la enzima responsable de la asimilación del oxígeno es la NADH oxidasa. Shimamura y col., en 1992 continuaron sus estudios y en sus experimentos obtuvieron crecimiento de *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* en condiciones de cultivo parcialmente aireado, mientras que el crecimiento de *B. adolescentis* fue suprimido en estas condiciones, mostrando una sensibilidad diferente al oxígeno. Todas estas cepas expresaron actividad de NADH oxidasa y NADH peroxidasa, las cuales funcionan reduciendo el oxígeno molecular, produciendo peróxido de hidrógeno y subsecuentemente, agua:

$$O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + NAD^+$$

$$H_2O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow 2H_2O + NAD^+$$

Los resultados de estos autores son interesantes, ya que las diferentes cepas mostraron diferentes niveles de actividad de estas enzimas, incluyendo *B. adolescentis,* que a pesar de que no creció en condiciones parcialmente aireadas también mostró diferentes niveles de actividad. Incluso las actividades enzimáticas no se vieron afectadas en condiciones no aireadas, bajo las cuales no debe haber influencia del oxígeno. Por otro lado Cox y Marling (1992), estudiaron también la asimilación del oxígeno en *B. bifidum* en la que detectaron actividad de NADH oxidasa, cuya estequiometría de la reacción correspondía a la producción de H_2O y no de H_2O_2 como en el estudio anterior.

En un estudio reciente, Talwalkar y Kailasapathy (2003), encontraron un cambio en la respuesta metabólica de cuatro especies de *Bifidobacterium* a diferentes ambientes de

oxígeno, entre ellos que la relación lactato a acetato disminuía al ir aumentando el porcentaje de oxígeno en el ambiente.

Existe un solo reporte de crecimiento de bifidobacterias que han crecido en agar en condiciones aerobias, aunque el tamaño de la colonia se redujo considerablemente en comparación con el crecimiento en anaerobiosis (de 3mm a 1mm). Esta especie recién identificada como *B. psychraerophilum* fue aislada del ciego de cerdo, donde aparentemente existe una alta concentración de oxígeno (Simpson y col., 2004).

Schell y col., (2002) han determinado la secuencia del genoma de *B. longum* NCC2705, y encontraron solo un gen homólogo para NADH-oxidasa. También encontraron otras tres proteínas que por predicción corresponden a proteínas que revierten el daño oxidativo causado a proteínas y lípidos, la enzima tiol peroxidasa, la alquil hidroperóxido reductasa (ahp C) y péptido-metionina sulfóxido reductasa. No se encontró una descripción funcional para aproximadamente 505 genes, de estos, 389 no tuvieron homólogos en las bases de datos, indicando que podrían ser específicos para *B. longum* o que corresponderían a genes que aún quedan por identificar en otros genomas. De acuerdo a esto, probablemente queden por identificar algunos de los genes correspondientes para la tolerancia al oxígeno como por ejemplo de la enzima NADH peroxidasa.

Se puede concluir a partir de los estudios anteriores que la aerotolerancia es diferente para cada cepa de bifidobacterias; por lo mismo se considera necesario probar la resistencia al oxígeno del microorganismo probiótico de forma particular e investigar si esta resistencia está acoplada a un cambio en el metabolismo de carbohidratos.

CAPITULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bifidobacterias se derivan del intestino humano, donde las condiciones ambientales en ausencia de oxígeno son las que prevalecen , consecuentemente estos organismos no están adaptados al oxígeno y la exposición a éste es letal.

Uno de los criterios de selección de un buen probiótico es que mantengan una viabilidad estable durante la manufactura del producto así como de la vida de anaquel del mismo (Mattila-Sandholm y col., 2002). La sensibilidad al oxígeno de estas bacterias probióticas es un factor importante que incide en este criterio. Para solucionar este problema de números bajos en las cuentas de los productos probióticos las cepas que pueden llegar a ser probióticos deben ser seleccionadas por su tolerancia al oxígeno.

La mayoría de las técnicas utilizadas en la literatura para medir la tolerancia al oxígeno en bacterias probióticas han sido cualitativas (De Vries y Stouthamer, 1969; Uesugi y Yamija, 1978; Meile y cols., 1997; Beerens y col., 2000; Shimamura y col., 1990, 1992), Por lo que es necesario establecer un sistema que nos permita medir la tolerancia al oxígeno de manera cuantitativa.

Así mismo en bifidobacterias no se había estudiado el efecto del oxígeno en la formación de los productos de fermentación hasta recientemente durante la elaboración de esta investigación ((Talwalkar y Kailasapathy 2003), por lo que también se consideró importante describir este efecto en la cepa de estudio.

Bifidobacterium infantis es una especie aislada de niños de la etapa lactante, por lo que esta cepa podría utilizarse para la elaboración de un mayor número de productos probióticos dirigidos a la población que es la mas sensible a enfermedades diarreicas. Para esta especie, se han reportado las actividades enzimáticas que contrarrestan el efecto tóxico del oxígeno por lo que cualitativamente ya se ha comprobado cierta tolerancia.

CAPITULO IV. HIPÓTESIS

Al aplicar condiciones de aireación controlada, *B. infantis* será capaz de crecer en presencia de concentraciones bajas de oxígeno.

Esta condición conducirá a un cambio en la formación de productos del metabolismo de glucosa, al redirigir las reacciones de óxido-reducción.

CAPITULO V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

DETERMINAR EL EFECTO DEL OXIGENO EN EL METABOLISMO DE GLUCOSA EN *Bifidobacterium infantis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- **Establecer las condiciones de crecimiento para el microorganismo en estudio, en anaerobiosis y en presencia de oxígeno.**
- **Determinar el grado de tolerancia al oxígeno de *B. infantis*.**
- **Evaluar el efecto del oxígeno en el crecimiento y en la formación de metabolitos principales (acetato, lactato y formato).**

CAPITULO VI. MATERIAL Y METODOS

6.1 Cepa

El microorganismo utilizado fue *Bifidobacterium infantis* ATCC 17930, el cual se conservó a –70° C en una mezcla de glicerol al 20% y leche descremada (Oxoid) al 10%.

6.2 Preparación del inóculo

A partir de la suspensión con el microorganismo que se encontraba en conservación, se inoculó 1 ml en 10 ml de caldo MRS (Oxoid) modificado, (MRS adicionado con 0.05% de cisteína HCl, $CaCl_2$ y $NaCO_3$, Desjardins y col., 1990) y se incubó en una jarra anaeróbica utilizando un sistema Gaspack (Oxoid) a 37° C por 24 horas. Posteriormente, este cultivo se transfirió a botellas de suero guardando una relación del 10% (v/v). El medio utilizado para las fermentaciones tanto en viales como en reactores fue TPYG: (g/L) glucosa 5, peptona de caseína 10; peptona de soya 5; extracto de levadura 2.5; cisteina 0.5; K_2HPO_4 2, $MgCl_2$ 0.5, $ZnSO_4$ 0.25; $CaCl_2$ 0.15; $FeCl_3$ 0.005; y 1 ml de Tween 80. Para los reactores se utilizaron botellas de suero de 1 L, selladas con tapón de hule y conteniendo 1,000 ml de medio TPYG. El medio TPYG se burbujeó previamente a la esterilización con CO_2. Este cultivo se coloca en una incubadora de agitación orbital a 37° C y 200 rpm por 12 horas aproximadamente cuando llega a fase exponencial media. Es importante no dejar que el cultivo del inóculo llegue a fase exponencial tardía, ya que debido a la acidez que se forma durante la fermentación, la fase estacionaria es muy corta y la transición a la fase de muerte es muy rápida (Apéndice 1).

ARCHIVO HISTORICO

6.3 Condiciones de fermentación

6.3.1 Fermentaciones en viales.

Se realizaron fermentaciones en frascos viales de 50 ml con 25 ml de medio de cultivo burbujeado por dos minutos ya sea con nitrógeno o CO_2 de alta pureza, se cerraron con tapón de hule y se sellaron con aro de aluminio. Se incubaron a 37°C y una agitación de 200 rpm. Las muestras se tomaron utilizando jeringas estériles de 3 ml.

6.3.2 Fermentaciones en reactores.

Se realizaron fermentaciones en un reactor de tanque agitado de 16 L (New Brunswick Scientific, Edison, N. J., USA), con un volumen de trabajo de 10 L.

6.3.2.1. Fermentaciones anaerobias.

Para las condiciones anaerobias el oxígeno fue desplazado del medio estéril al burbujear CO_2 de alta pureza hasta que el porcentaje de oxígeno disuelto relativo a la saturación del aire (% OD) llegara a cero. El medio fue entonces inoculado y se mantuvo un flujo constante de CO_2 de aproximadamente 200 ml min^{-1} y una agitación de 100 rpm a 37° C.

6.3.2.2. Fermentaciones aireadas.

Para las condiciones aireadas, se alcanzó primero 0% de OD utilizando el procedimiento ya descrito para las fermentaciones anaerobias, posteriormente el flujo de CO_2 se cerró, se inoculó el medio e inmediatamente se aplicó un flujo de aire constante en unidades de vvm. (volumen de aire, por volumen de medio por minuto) que se controla a través de un rotámetro (Gilmont instruments, Great Neck, N:Y:, USA). Los flujos de aire

variaron según la condición y el rango utilizado fue de 0.02 vvm hasta 0.1 vvm. La agitación de 100 rpm se mantuvo constante durante el tiempo de fermentación. En todos los casos el pH del medio y el porcentaje de OD fue registrado utilizando un potenciómetro de vidrio (Mettler-Toledo, Process Analytical, Mass., USA) y un electrodo de oxígeno galvánico (New Brunswick Scientific), respectivamente. Los experimentos se hicieron por duplicado. En todas las fermentaciones el pH se ajustó a 6,5 al inicio del cultivo.

6.4 Métodos Analíticos.

Se tomaron muestras cada hora y se analizaron como sigue:

6.4.1. Crecimiento.

La concentración celular se monitoreo al medir la densidad óptica a 660 nm. El peso seco fue determinado al filtrar 3 ml de muestra a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45μm (Millipore) , se lavaron con 10 ml de agua destilada y se secó hasta peso constante a 50° C. Se calculó la correlación entre la densidad óptica y el peso seco donde la ecuación de la curva fue $y = 0.4125x-0.0902$.

6.4.2. Cuantificación de Glucosa, acetato, lactato y formato.

Los productos de fermentación y la glucosa, se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (Perkin Elmer) utilizando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Richmond, Calif., USA) a temperatura ambiente con un flujo de 0.6 ml min^{-1} utilizando H_2SO_4 (0.01N) como eluyente y un detector de índice de refracción (Perkin Elmer LC-30). Una porción de cada muestra se centrifugó (8,000 g por 15 min a 4° C), y el sobrenadante se guardó a –20° C para los análisis cromatográficos subsecuentes, estas

muestras al descongelarse, se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa de 0.2μm (Millipore).

El porcentaje de carbono (C) recuperado se calculó multiplicando las mmoles de producto formado por el número de carbonos de cada metabolito, divididos por las mmoles de C en el sustrato utilizado y multiplicado por 100.

6.5 Estimación de los parámetros cinéticos.

La tasa específica de crecimiento (μ h^{-1}) se estimó durante la fase exponencial de crecimiento por regresión lineal de ln *X/Xo* (peso seco) vs. tiempo. Los rendimientos de biomasa y producto ($Y_{x/s}$ g de peso seco por mmol de glucosa consumida y $Y_{p/s}$ mmol de producto por mmol de glucosa consumida, respectivamente) se calcularon como la relación entre ya sea biomasa o producto (acetato, lactato o formato) producidos por la glucosa consumida. Las tasas específicas de formación de producto (g de producto por gramo de peso seco por hora) fueron calculadas como $\mu/Y_{x/p}$ (Pirt 1975), donde $Y_{x/p}$ es el rendimiento de biomasa referido a la formación de producto (g de peso seco por gramo de producto).

6.6 Determinación de k_La (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno) y Q_{O2} (tasa específica de consumo de oxígeno)

La determinación de k_La se llevó a cabo en función de la presencia de células y del flujo de aire, (0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 vvm); y a condiciones constantes de temperatura (37°C) y agitación (100 rpm).

Las pruebas sin células se hicieron utilizando la técnica de desorción (gassing out) en la cual el oxígeno disuelto se elimina al burbujear el medio con nitrógeno, desplazando por

completo al oxígeno. El medio libre de oxígeno es entonces aireado y agitado, registrándose un incremento en la concentración de oxígeno disuelto que se describe por medio de la ecuación: $dc_L/dt = k_La\,(c^* - c_L)$; que integrada resulta en:

$\ln (c^* - c_L) = -k_La t + \ln c^*$. Al graficar $\ln (c^* - c_L)$ en función del tiempo de aireación, se obtiene una recta con pendiente, igual a $-k_La$ y ordenada al origen, igual a $\ln c^*$ (Stansbury y Whitaker, 1984).

La determinación simultánea de k_La y de Q_{O2} (mmol de oxígeno por gramo de peso seco por hora) fue hecha a partir del balance de oxígeno $dc_L/dt = k_La\,(c^* - c_L) - Q_{O2}X$; en donde: k_La (h^{-1}) es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno; $c^* = 0.25$ mM. es el valor de saturación del oxígeno disuelto y c_L es la concentración del gas en cada momento; X ($g.L^{-1}$) es la concentración de células. Al graficar: $(dc_L/dt)/(c^* - c_L)$ en función de $X/(c^* - c_L)$ se obtiene el valor de Q_{O2} de la pendiente de la recta resultante y el k_La de su ordenada al origen.

CAPITULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Fermentaciones anaerobias

7.1.1. Selección de ambiente para crear condiciones anaerobias.

Para lograr el ambiente anaerobio se comparó el uso de nitrógeno y de CO_2.

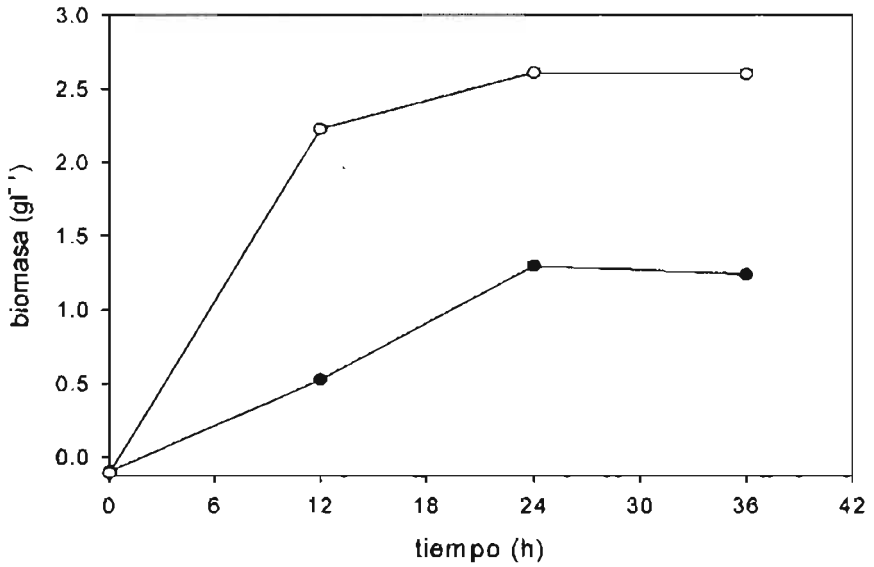

Fig. 4. Crecimiento de *B. infantis* en viales burbujeados con N_2 de alta pureza (•) o con CO_2 (o).

En la figura 4 se puede observar que el crecimiento de *B. infantis* en presencia de CO_2 fue más rápido y de aproximadamente el doble en producción de biomasa que en la condición con nitrógeno (Tabla 3). Los resultados de rendimiento de biomasa muestran así mismo, una mayor cantidad de células por mol de glucosa consumida en la condición con CO_2. Otra observación fue que el uso de diferentes gases alteró la proporción de ácidos

orgánicos, productos del metabolismo de glucosa. En la condición con nitrógeno se obtuvieron más moles de lactato y acetato por gramo de célula y una producción específica significativamente menor de formato, aunque la dirección del flujo de carbono hacia lactato y acetato fue prácticamente la misma para ambas condiciones, no así para el formato, con el cual el porcentaje de carbono fue de 10 veces más alta en la condición con CO_2 (Tabla 3).

Tabla 3 Comparación de parámetros de las fermentaciones utilizando ambiente con nitrógeno o con CO_2 [c]

	Nitrógeno	CO_2
Biomasa gl^{-1}	1.3	2.6
Glucosa consumida mM (mmol de carbono)	19.62 (117.72)	27.75 (166.5)
Lactato		
mM (mmol de carbono, %) mmol g^{-1}	15.5 (46.5, 39.5) 11.94	22.4 (67.2, 40.36) 8.6
Acetato		
mM (mmol de carbono, %) mmol g^{-1}	25.05 (50.1, 42.5) 19.3	33.15 (66.3, 39.8) 12.7
Formato		
mM (mmol de carbono, %) mmol g^{-1}	0.03 (0.03, 0.025) 0.025	0.49 (0.49, 0.29) 0.18
[a]Yx/s	0.066	0.094
[b]$Y_{Lac/s}$	0.79	0.807
[b]$Y_{Ac/s}$	1.27	1.19
[b]$Y_{For/s}$	0.002	0.018

[a]g peso seco por mmol de glucosa
[b]mmol de producto por mmol de glucosa
[c] los cálculos se realizaron con los datos obtenidos a las 24 h de fermentación.

El criterio para elegir la forma de lograr condiciones anaerobias aparentemente es simple. Cuando se usan matraces Erlenmeyer o viales se burbujean por cierto tiempo hasta lograr el desplazamiento total del oxígeno, pero al detener el burbujeo para sellar el vial, cierta cantidad no determinada puede entrar al frasco. Existen indicadores de anaerobiosis como la rezasurina, sin embargo algunos componentes del medio de cultivo pueden interferir con la reacción y no permitir una apreciación adecuada del estado anóxico del líquido. El uso de un reactor, a diferencia de los viales, asegura un desplazamiento de oxígeno mas completo ya que la aspersión es directa al medio de cultivo en un contenedor sellado; también es posible llevar un registro de la cantidad de oxígeno disuelto por medio de un electrodo.

En experimentos posteriores se aplicó nitrógeno a un fermentador de 4 litros. En estas condiciones, contrario a la condición con nitrógeno en viales, el microorganismo no creció. Se repitió esta fermentación con nitrógeno en el reactor, utilizando en esta ocasión un cultivo control en viales burbujeados con nitrógeno inoculados con el mismo cultivo y siguiendo el procedimiento habitual. Se pudo observar que a pesar de que en los viales burbujeados se presentó crecimiento de *B. infantis*, el saturar el reactor con nitrógeno no permitió el desarrollo de este microorganismo (Figura 5). Una posible explicación para estos resultados, podría ser que durante la manipulación de los viales, como se mencionó anteriormente, el desplazamiento de oxígeno no es total, quedando en el líquido trazas de aire y permitiendo que se mantengan ciertas condiciones reductoras necesarias para el crecimiento del microorganismo.

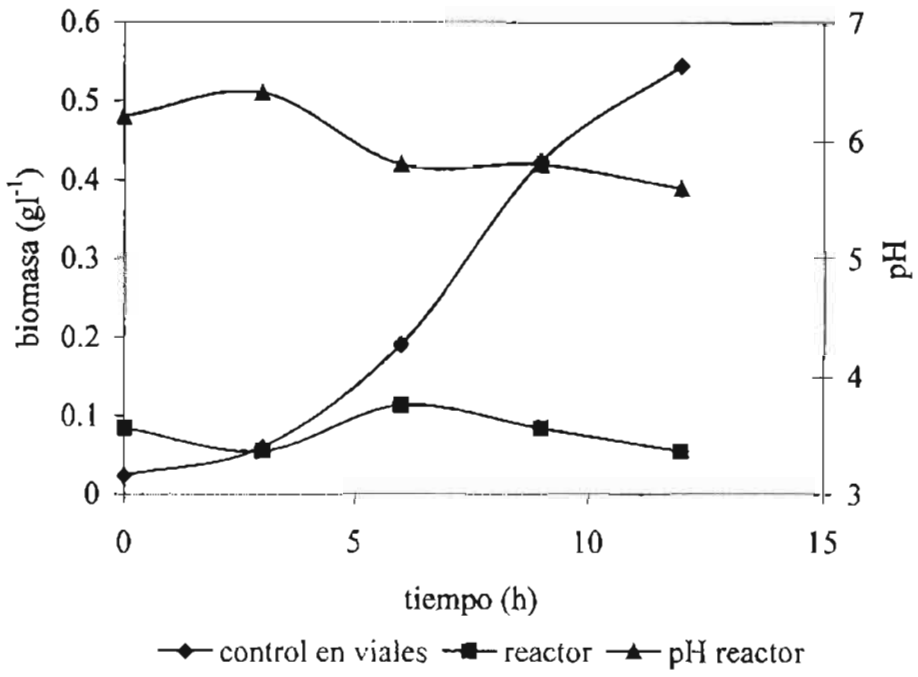

Fig. 5 Crecimiento de *B. infantis* en fermentador burbujeado con nitrógeno de alta pureza. Se llevó a cabo un control en viales burbujeados con nitrógeno utilizando el mismo inóculo. El medio de cultivo fue TPYG a 37° C.

Las condiciones reductoras se favorecen con el uso de CO_2, así cuando se utilizó una mezcla de CO_2/N_2 en el reactor (Figura 6) se obtuvo un buen crecimiento de *B. infantis*; y mejor cuando se utilizó CO_2 al 99% de pureza (Figura 7). Esta última condición es la que posteriormente se continuó utilizando como control de crecimiento en anaerobiosis.

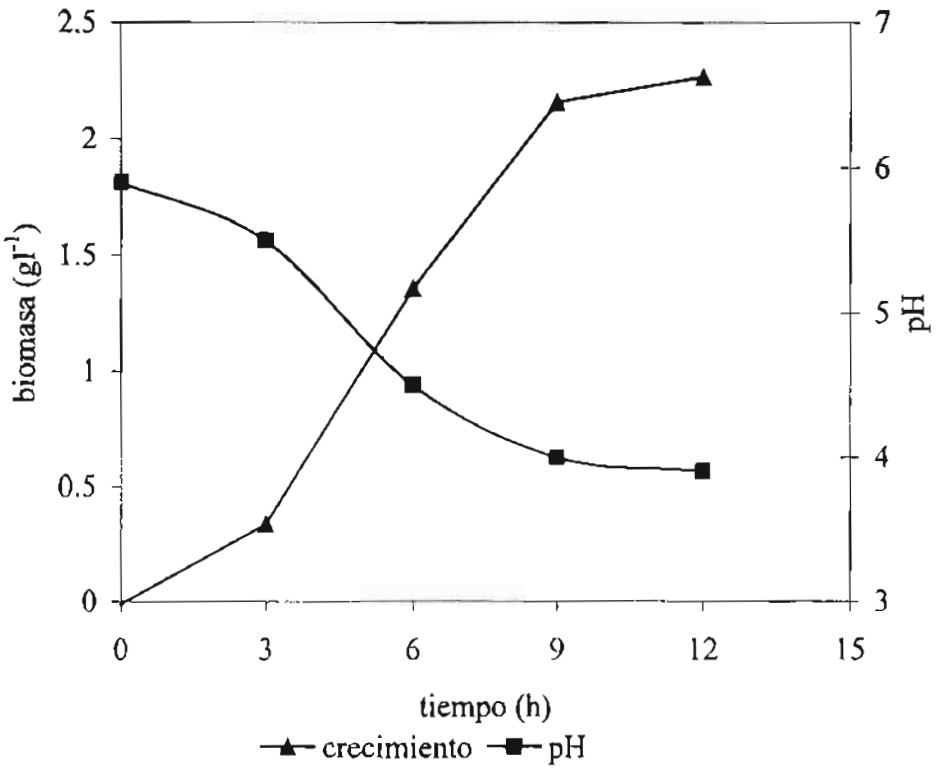

Fig. 6. Crecimiento de *B. infantis* en fermentador burbujeado con una mezcla de nitrógeno al 80% y CO_2 al 20%.

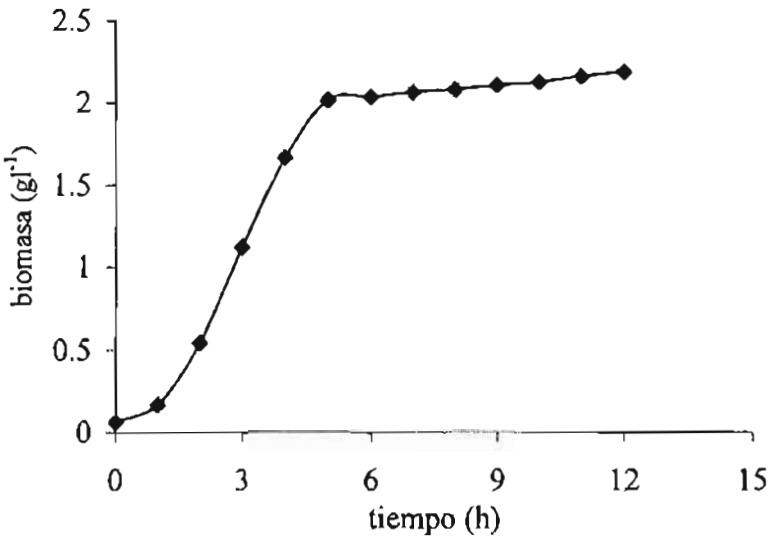

Fig. 7. Crecimiento de *B. infantis* en un reactor con CO_2 al 99%

7.1.2 Efecto del CO_2 en la fisiología de bacterias.

El efecto estimulante del CO_2 en algunas especies de bifidobacterias se ha mencionado brevemente en estudios donde se describen de forma general las condiciones de cultivo para esas cepas en particular (Biabati y Mattarelli, 1991), sin embargo este efecto estimulante no se ha caracterizado.

En *Lactobacillus pentosus* se ha encontrado un alto requerimiento de CO_2 el cual es utilizado por este microorganismo para sintetizar arginina y pirimidinas. Al parecer esta dependencia por CO_2 está relacionada con la biosíntesis de un intermediario común: el carbamoil fosfato y en cuya biosíntesis a su vez, se requiere de CO_2 (Bringel & Hubert, 2003). La función fisiológica del CO_2 ha sido muy investigada en microorganismos fotosintéticos, sin embargo, actualmente se sabe que las enzimas que utilizan como sustrato al CO_2 (anhidrasas carbónicas) se presentan en el metabolismo de procariontes, tanto en *Archeae* como en *Bacteriaceae*, e incluso algunas especies contienen mas de una clase de estas enzimas (Smith y Ferry, 2000).

Son dos las funciones principales para las anhidrasas carbónicas:

1. Transporte de CO_2 ó HCO_3^- y
2. Proporcionar CO_2 ó HCO_3^- para reacciones enzimáticas tales como reacciones de carboxilación o descarboxilación acopladas a la generación de energía.

Smith y Ferry, (2000) han identificado hasta 59 reacciones diferentes en bacterias donde el CO_2 o el HCO_3^- participan. En algunas reacciones se puede utilizar ya sea CO_2 o HCO_3^-, de modo que las anhidrasas carbónicas pueden ser necesarias para interconvertir estos compuestos para asegurar una concentración adecuada en la vecindad de la enzima.

Otras reacciones que se han identificado son la síntesis de oxalacetato catalizada por la piruvato carboxilasa:

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + HCO^-_3 \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

así como la fosfoenol-piruvato carboxilasa.

$$\text{Fosfoenol-piruvato} + HCO^-_3 + \text{ATP} \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

7.2 Fermentaciones aireadas

7.2.1 Crecimiento y consumo de oxígeno

Se realizó inicialmente una prueba en la que el medio de cultivo se saturó al 100% de oxígeno disuelto, se inoculó con el microorganismo y en ese momento se interrumpió la aireación. En la Figura 8 observamos estos resultados donde el % de OD bajó de 100% a 69% aunque este consumo se detuvo ya que no se obtuvo crecimiento de *B. infantis* debido a su naturaleza anaerobia. Este resultado indicó que en condiciones altamente estresantes esta cepa pudo activar de algún modo las enzimas que le permiten utilizar el oxígeno.

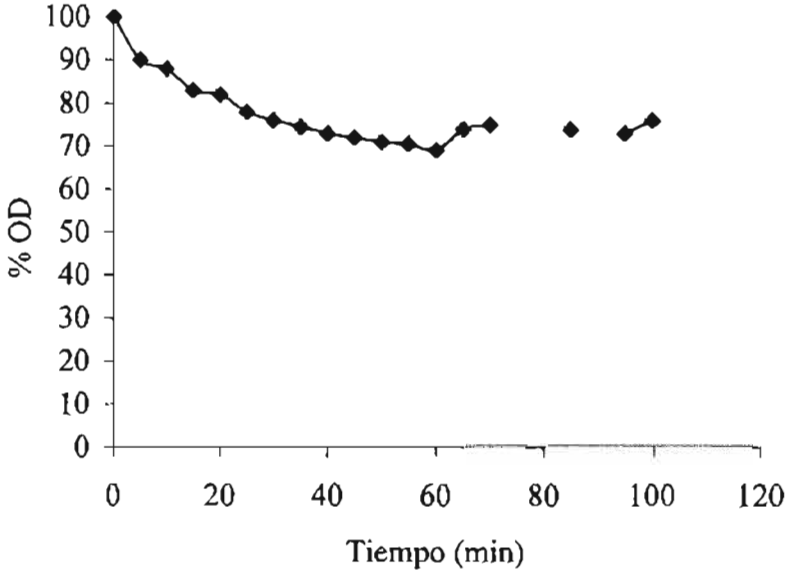

Fig. 8. Evolución del porcentaje de oxígeno disuelto (% OD) al inocular con *B. infantis* en condiciones de saturación de oxígeno.

Al desconocer el nivel de tolerancia al oxígeno de *B. infantis*, se procedió a utilizar flujos de aire muy bajos: 200, 400, 600, 800, y 1000 ml min^{-1} equivalentes a flujos de

0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 v.v.m. respectivamente. En las figuras 9 y 10 se compara el perfil de % de OD en medio TPYG al aplicar al medio aire en un reactor sin inocular y otra condición con células. En estos experimentos, durante la primera hora, no existió diferencia entre ambos en la incorporación del oxígeno al medio, sin embargo a partir de ese momento el consumo de oxígeno por el microorganismo cambió el perfil de oxígeno en el cultivo.

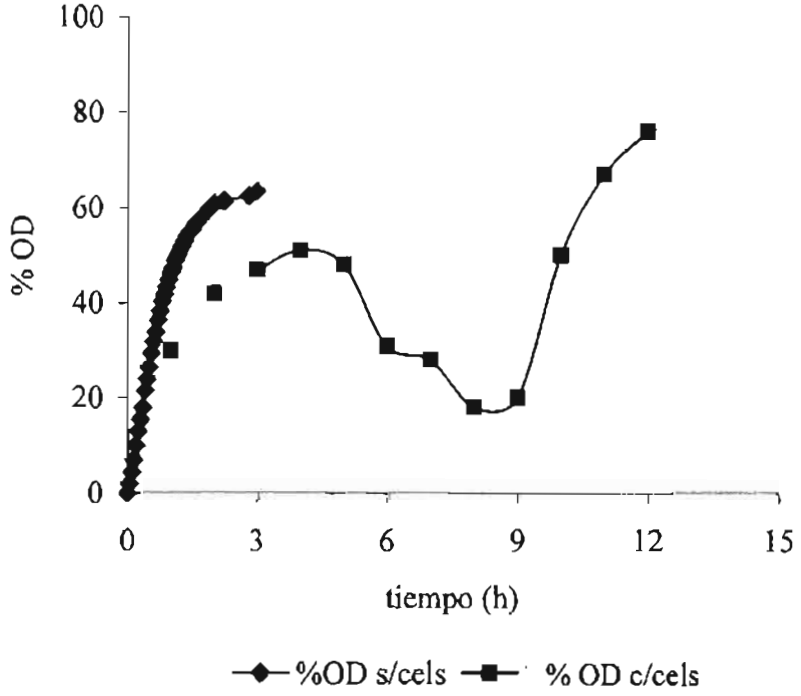

Fig. 9. Perfil de % de OD en medio TPYG sin células y con células con un flujo de aire de 0.02 vvm.

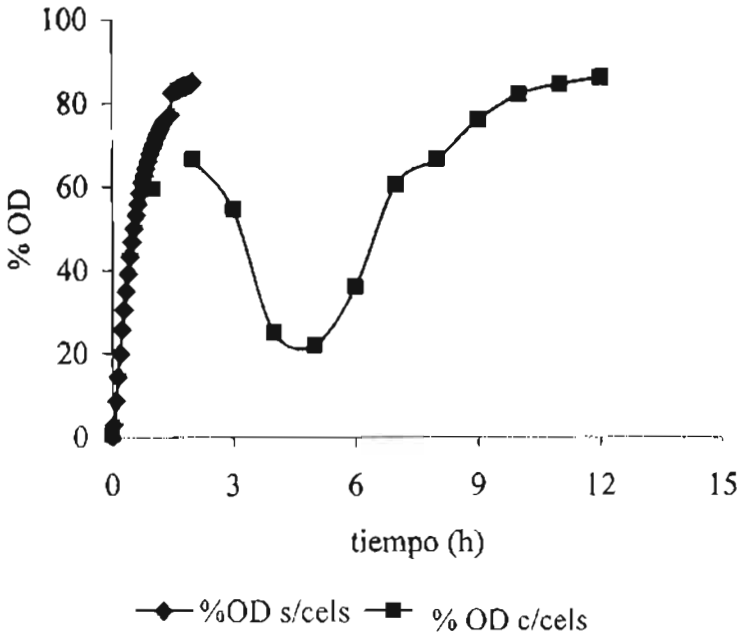

Fig. 10. Perfil de % de OD en medio TPYG sin células y con células con un flujo de aire de 0.04 vvm.

Para el caso de las fermentaciones aireadas, el crecimiento de *B. infantis* solo fue posible cuando el flujo de aire se suministró después de inocular al microorganismo. Como se observa en la Figura 11 (A-F), donde se muestra el perfil de oxígeno y el crecimiento del microorganismo en las condiciones de aireación mencionadas, comparándose con el cultivo en anaerobiosis. En esta serie de fermentaciones, el porcentaje de oxígeno disuelto (% OD), fue aumentando rápidamente durante la primera hora y disminuyó justo cuando el cultivo entró a la fase de crecimiento exponencial. El consumo máximo de oxígeno por el microorganismo se presentó en la fase exponencial media, durante la cual se puede observar un declive drástico en las curvas de % OD (Figura 11 B-F). Bajo estas condiciones, el microorganismo fue capaz de soportar un crecimiento casi a la par que en el ambiente anaerobio (Figura 11 A). En todas las condiciones aireadas, el consumo de oxígeno cesó al detenerse a su vez el crecimiento, en coincidencia con la entrada del cultivo

a fase estacionaria. Esto confirma la capacidad de asimilación del oxígeno por el microorganismo.

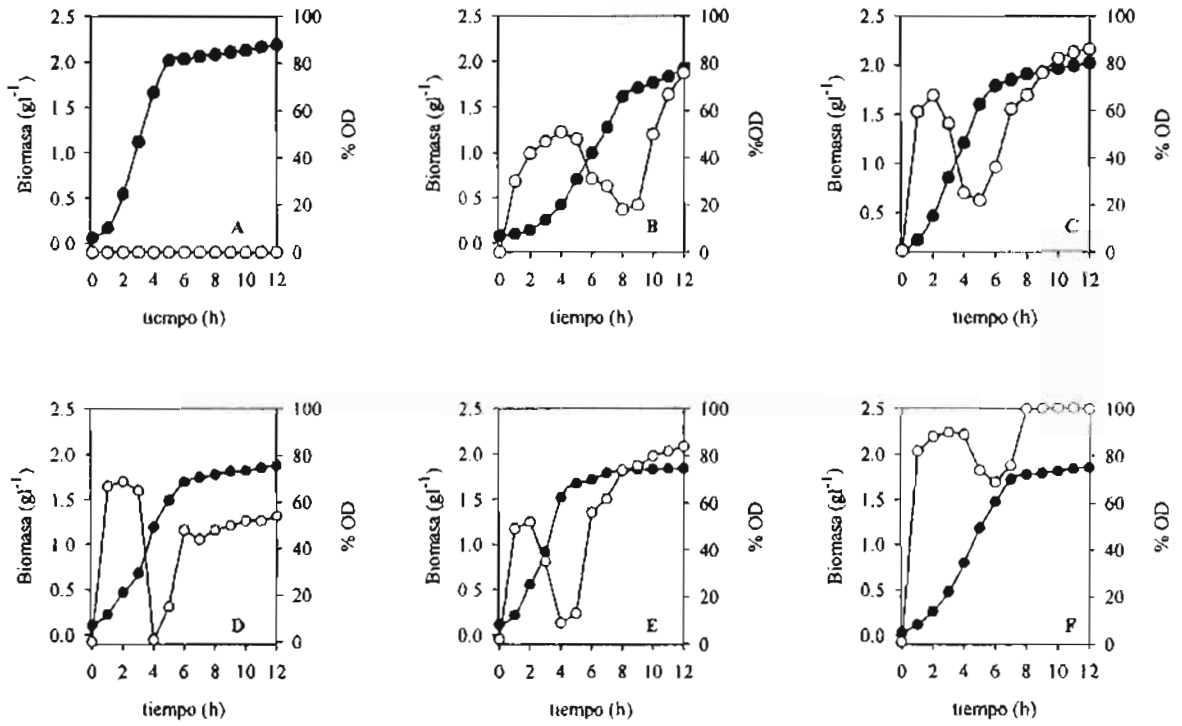

Fig. 11 Crecimiento (•) y perfil de oxígeno (% OD =porcentaje de oxígeno disuelto) (o) en condiciones anaerobias y aireadas. Anaerobiosis (A); Fermentaciones Aireadas (flujo de aire, en v.v.m.: volumen de aire por volumen de líquido por minuto): 0.02 (B), 0.04 (C), 0.06 (D), 0.08 (E) y 0.1 (F).

Aparentemente el hecho de comenzar las fermentaciones aireadas a partir de 0% de OD, permitió una incorporación progresiva del oxígeno, permitiendo así también que *B. infantis* pudiera soportar concentraciones de oxígeno tan altas como del 80% (Figura 11-F), mostrando una alta aerotolerancia bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

7.2.2 Tasa específica de consumo de oxígeno (Q O_2)

Los valores en la tasa específica de consumo de oxígeno (QO_2: mmol de oxígeno asimilado por gramo de peso seco por hora) se aumentaron de 0.02 a 0.34 mmol O_2 g^{-1} h^{-1} en los flujos de aire de 0.02 a 0.06 vvm, respectivamente, y este valor disminuyó al aumentar los flujos de aire (Tabla 4). El valor más alto de 0.34 mmol O_2 g^{-1} h^{-1} es diez

Tabla 4. Concentraciones de biomasa, rendimientos molares de biomasa y tasa específica de asimilación de oxígeno durante las fermentaciones anaeróbicas y aireadas con *B. infantis* en medio TPYG a 37° C.

Flujos de aireación (vvm)	Biomasa (gl^{-1})	Rendimiento de Biomasa [a] (g $mmol^{-1}$)	Tasa epecífica de consumo de oxígeno (mmol of O_2 g^{-1} h^{-1})
0	2.1 ± 0.06	0.11 ± 0.007	ND[b]
0.02	1.84 ± 0.09	0.11 ± 3.6 x 10^{-5}	0.02
0.04	1.92 ± 0.08	0.12 ± 0.03	0.11
0.06	1.85 ± 0.08	0.11 ± 0.0004	0.34
0.08	1.81 ± 0.09	0.13 ± 0.039	0.10
0.1	1.59 ± 0.09	0.11 ± 0.012	0.04

[a]Peso seco por mM de glucosa consumida.
[b]ND. No determinado.
Los resultados son la media de dos experimentos independientes.

veces más bajo que el valor de QO_2 respectivo de 3.61 para *Lactococcus lactis* MG1363, que es un anaerobio facultativo (Jensen y col., 2001). En la Tabla 5 se presentan algunos ejemplos en donde se calculó el QO_2 para otros microorganismos anaerobios aerotolerantes como *Propionibacterium shermanii*, *L. lactis* mencionado anteriormente, un aerobio facultativo como *E. coli* y *H. uvarun* que es una levadura. Estos dos últimos microorganismos a diferencia de los otros poseen cadena respiratoria y pueden utilizar al

oxígeno como aceptor de electrones, lo cual se ve reflejado en los valores de QO_2 determinados para estas cepas.

Tabla 5 Comparación de la tasa específica de consumo de oxígeno en diferentes microorganismos.

Cepa	QO_2 (mmol O_2 $g^{-1}h^{-1}$)	Referencia
B. infantis	0.34	este trabajo
Propionibacterium shermanii	2.68	Azaola y cols (2004)
Lactococcus lactis	3.6	Jensen y cols (2001)
Escherichia coli	8.3/10.6	Sauer y cols(1999)
Hanseniaspora uvarun	11	Venturin y cols (1995)

En general, los datos del comportamiento del consumo de oxígeno en microorganismos anaerobios aerotolerantes o microaerofílicos son muy escasos. Los términos anaerobio estricto, anaerobio facultativo o microaerofílico son ambiguos en el sentido práctico, por lo que sería interesante determinar el QO_2 en un mayor número de microorganismos de metabolismo tanto anaerobio (pero tolerantes al oxígeno), como microaerofílico para poder evaluar la tolerancia al oxígeno de manera cuantitativa. En el caso de las especies de bifidobacterias, este dato podría permitir evaluar entonces, su potencial para utilizarlas en la elaboración de probióticos a nivel industrial; ya que, una cepa considerada como probiótica debe ser seleccionada tanto por sus características funcionales en el huésped, como también por su habilidad de mantener la viabilidad y la funcionalidad durante la manufactura y almacenamiento del producto probiótico (Saarela y col., 2000).

7.2.3. Relación entre QO_2 y NADH oxidasa

Como se mencionó anteriormente, la caída del % OD durante la fase de crecimiento exponencial confirmó la asimilación de oxígeno por el microorganismo. Shimamura y col., (1992), reportaron que la enzima NADH oxidasa es la principal enzima responsable del consumo de oxígeno por *B. infantis*, ya que la actividad de la superóxido dismutasa tuvo una actividad poco significativa y contribuyó muy poco a la reducción del oxígeno por estos microorganismos. Se podría entonces considerar que los valores de QO_2 están reflejando la actividad *in vivo* de la enzima NADH oxidasa. El valor máximo de QO_2 fue en la condición con 0.06 vvm (Tabla 4), al ir aumentando el flujo de aire, este valor disminuyó, sugiriendo que las actividades de las enzimas involucradas en el sistema de tolerancia al oxígeno de *B. infantis* están reguladas o pierden capacidad de metabolizar. Se ha observado inducción de la NADH oxidasa en presencia de condiciones aerobias en algunos *Streptococcus* spp (Matsumoto y col., 1996), así como en otras bacterias anaerobias facultativas, *Zymomonas mobilis* (Nishiyama y col., 2001). Además Talwalkar y Kailasapathy (2003), reportaron que la NADH oxidasa y NADH peroxidasa son inducidas en *B. infantis, B. lactis, B. pseudolongum y B. longum.*

7.2.4 Efecto de la aireación sobre la producción de biomasa y metabolitos.

La concentración de biomasa de *B. infantis* fue inferior en las fermentaciones aireadas que en la anaerobia, sin embargo, todos los rendimientos de biomasa fueron similares (Tabla 4). La aireación no impidió la fermentación de la glucosa ya que se produjeron los metabolitos principales de la vía de las bifidobacterias. Las condiciones anóxicas rindieron una relación molar de acetato: lactato de 3:1, como se ha reportado

previamente para bifidobacterias (Wolin y col., 1998). La relación acetato:lactato cambió a un promedio de 1.8:1 en todas las fermentaciones aireadas (Tabla 6).

En el caso de la producción de acetato, se observaron variaciones ligeras tanto en los valores de producción como en los rendimientos molares. La producción de acetato en las fermentaciones aireadas a 0.04 y 0.06 vvm fueron similares a las de la condición anaerobia, pero a 0.02, 0.08 y 0.1 vvm el valor fue más bajo (Tabla 6).

Por el contrario, la producción de lactato fue considerablemente más alta en presencia de aire, aumentando más del doble en las condiciones de 0.06 y 0.08 vvm comparándoles con la condición anaerobia. Los valores de rendimiento molar de lactato también fueron de al menos del doble cuando se aplicaron los flujos de aire y en consecuencia las relaciones molares acetato:lactato disminuyeron (Tabla 6). Bajo las condiciones de aireación, de un 19 a un 35% más de carbono fue recuperado como lactato en comparación con la fermentación anaerobia (Tabla 7). En cuanto a la producción de formato, esta fue prácticamente nula en la presencia de aire, mientras que *B. infantis* crecida sin oxígeno acumuló 5.3 mM de este metabolito. La enzima piruvato formato liasa, es la responsable de la síntesis de formato, esta enzima es muy sensible al oxígeno (Sawers y Bock, 1988); de acuerdo con esta información en presencia de aire sólo se encontraron restos de formato (Tabla 6). Este cambio en la proporción de los productos finales del metabolismo de glucosa, en presencia de aire podrían ser benéficos desde el punto de vista tecnológico, de modo que las características sensoriales del producto podrían mejorar con una proporción más alta de lactato y la desaparición de formato.

Un patrón que podemos observar en los valores de rendimiento, tanto de acetato como de lactato, es que coinciden con el mismo perfil que los valores de Q_{O2}. Aparentemente, al ir aumentando el flujo de aire, el microorganismo va a su vez

aumentando el consumo de oxígeno y a su vez los rendimientos de estos metabolitos, hasta llegar a un punto donde disminuyen de nuevo; para Q_{O2} y acetato en la condición de 0.08 vvm y para lactato en la condición de 0.1 vvm. Este comportamiento nos podría estar indicando una posible inhibición. a partir de cierto flujo de aire. Durante la transformación del O_2 se pueden estar formando algunos derivados tóxicos, uno de ellos es el peróxido de hidrógeno, el cual podría estar afectando tanto la capacidad de absorción de oxígeno por el microorganismo, como los rendimientos en los metabolitos; no así en los rendimientos de biomasa. Shimamura y col., (1992) trabajaron con *B. infantis* ATCC 15697, y al crecerla en condiciones aeróbias encontraron acumulación de peróxido de hidrógeno, sin embargo esta misma cepa mostró una gran resistencia a diferentes concentraciones de este compuesto, debido a que también presentó actividad de NADH peroxidasa.

Tabla 6. Concentración de metabolitos y rendimientos de productos a las 12 h, para fermentaciones anaeróbicas y aireadas en medio TPYG a 37° C.

	Concentración de Metabolitos (mM)			Rendimiento de Producto (mmol de producto por $mmol^{-1}$ de glucosa)			
Flujos de aireación v.v.m.	Acetato	Lactato	Formato	Acetato	Lactato	Formato	Relación molar Ac:Lac
0	27.5 ± 3.9	8.1 ± 0.53	5.30 ± 0.07	1.45	0.43	0.28	3.4:1
0.02	22.8 ± 1.3	13.5 ± 0.65	ND[a]	1.37	0.82	ND[b]	1.7:1
0.04	28.4 ± 1.6	14.4 ± 0.34	0.72 ± 0.73	1.86	0.94	0.05	1.9:1
0.06	33.2 ± 4.2	18.3 ± 0.88	0.67 ± 0.67	1.98	1.09	0.04	1.8:1
0.08	23.2 ± 4.9	16.5 ± 0.22	0.11 ± 0.1	1.68	1.16	0.01	1.4:1
0.1	20.0 ± 1.1	11.8 ± 0.56	0.28 ± 0.27	1.37	0.81	0.02	1.7:1

ND[a]= No detectado; ND[b]= No determinado. Los datos son el promedio de dos experimentos.

En la Tabla 7, se muestra el balance de carbono teórico de acuerdo a la vía metabólica de glucosa propuesta por Degnan y Mcfarlane (1994) (Fig. 3); así como los resultados para las diferentes fermentaciones. En la condición de anaerobiosis se alcanza un 73.5% de carbono total, lo que significa que un 26.4 % de carbono se está convirtiendo en un metabolito no cuantificado. Según Degnan y Mcfarlane (1994), Rasic y Kurmann, (1983); Lauer y Kandler, (1976); y De Vries y Stouthamer, (1968) este metabolito debe ser etanol. De acuerdo a la estequiometría de la formación de metabolitos en anaerobiosis para

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

bifidobacterias, a partir de piruvato se producen 0.5 M de formato y 0.25 M de etanol por mol de glucosa; la concentración calculada entonces, para etanol sería la correspondiente a la mitad de la concentración del formato producido. Es decir, en la condición de anaerobiosis experimental tendríamos 2.6 mM de etanol y un rendimiento de 0.137 mmoles de etanol por mmol de glucosa, con a su vez, un % de C de 4.6 dirigido hacia la producción de este metabolito. El rendimiento obtenido de lactato en la condición experimental de anaerobiosis fue de 0.43 (tabla 6), semejante al teórico de 0.5 (tabla 7), sin embargo, los rendimientos de acetato, formato y etanol son menores; si sumamos el porcentaje de C calculado para etanol al porcentaje de C total para esa condición nos resulta un total de 78.1 %, por lo que es probable entonces que exista la producción de algún metabolito no contemplado como importante en el metabolismo de bifidobacterias.

En las condiciones aireadas se sobrepasa ligeramente el 100% de carbono excepto para las condiciones con 0.02 y 0.1 vvm (Tabla 7), sin embargo, como prácticamente no se produce formato, se descarta que el piruvato se haya desviado hacia la formación de formato, etanol y acetato por esa vía. Como se mencionó en la sección de antecedentes (ver p. 14) , en el metabolismo de las bifidobacterias se han reportado dos vías posibles para la diversificación de piruvato, una es la producción solo de lactato y otra en la que en ciertas condiciones de cultivo se pueden formar también etanol y formato.

En bacterias ácido lácticas se ha observado, un cambio en el metabolismo de azúcares al cambiar el ambiente del cultivo de anaerobiosis a aerobiosis, este cambio se refleja principalmente en el aumento en la producción de acetato y disminución de lactato, esto podría aumentar la formación de ATP al doble (Condon 1987). El metabolismo de bacterias homolácticas cambia de lactato a acetato en la presencia de oxígeno y de etanol a acetato en las bacterias heterolácticas (Sakamoto y Komagata 1996). Nuestros resultados

muestran que en presencia de oxígeno, se favorece la producción de lactato y la vía fosforoclástica se inhibe, en cambio en anaerobiosis se favorece la vía fosforoclástica. En la Fig. 11 se muestran comparativamente las vías homofermentativa, heterofermentativa y la vía de las bífidobacterias.

Meile y col. (1997), encontraron que *B. lactis* tolera hasta un 10% de oxígeno suministrado en el espacio vacío (headspace) del fermentador. En este estudio, en la presencia de oxígeno, las concentraciones de lactato fueron más altas que bajo condiciones anóxicas; 5.6 mM para el cultivo anaerobio y 9.9 mM para el aireado. El incremento en la producción de lactato disminuyó la relación acetato:lactato de 10.1:1 a 4.7:1. De manera similar, nuestros resultados muestran que la relación acetato:lactato en *B. infantis* disminuyó en la presencia de aire como resultado de los aumentos en la producción de lactato, indicando un cambio en el metabolismo de carbohidratos (Tabla 6). En otro estudio, conducido con cuatro especies de bifidobacterias, (Talwalkar y Kailasapathy 2003), el oxígeno aparentemente disminuyó la producción de lactato a diferencia de nuestros resultados. Sin embargo, una comparación de los resultados en ambos estudios es difícil ya que se utilizaron diferentes cepas, diferentes medios de cultivo y diferentes condiciones de aireación.

En síntesis se puede aseverar que los cambios que se dan en el metabolismo de glucosa por el efecto del oxígeno, son principalmente en la producción de metabolitos que dependen de equivalentes reductores tales como lactato y etanol. Los cambios en la producción de formato y acetato deben estar dados por la sensibilidad al oxígeno de las enzimas piruvato-formato-liasa y acetato cinasa ya sea a nivel bioquímico o de regulación genética.

Tabla 7. Balance de Carbono

Airea-ción vvm	Glucosa consumida mM	C (%)	Acetato mM	C (%)	Lactato mM	C %	Formato mM	C (%)	Etanol mM	C (%)	C (%) Total
Anaeró-bio teórico	1	6 (100)	1.75#	3.5 (58.3)	0.5	1.5 (25)	0.5	0.5 (8.3)	0.25	0.5 (8.3)	99.9
Anaeró-bio experi-mental	19.25	115	27.5	55 (47.8)	8.1	24.3 (21.1)	5.3	5.3 (4.6)	*		73.5
0.02	16.56	99.36	22.8	45.6 (45.9)	13.5	40.5 (40.8)	ND[1]	0	*		86.7
0.04	16.32	97.92	28.4	56.8 (58)	14.4	43.2 (44.1)	0.72	0.72 (0.73)	*		102.8
0.06	16.92	101.52	33.2	66.4 (65.4)	18.3	54.9 (54.1)	0.67	0.67 (0.65)	*		120.1
0.08	14.68	88.08	23.2	46.4 (52.6)	16.5	49.5 (56.2)	0.11	0.11 (0.12)	*		108.9
0.1	14.71	88.26	20.0	40 (45.3)	11.8	35.4 (40)	0.28	0.28 (0.31)	*		85.61

Los valores en paréntesis son los porcentajes de glucosa convertidos a producto
*No se cuantificó
1.75#. Equivale a 1.5 mM de acetato vía fosfocetolasa + 0.25 mM vía piruvato (enzima fosforoclástica).

7.2.5 Cinética de las fermentaciones en condiciones anaerobias y aireadas

La tasa de consumo de glucosa (q_S), fue más alta en anaerobiosis (1.6 g glucosa por g de peso seco por hora) que en las fermentaciones aireadas (Fig. 12), pero un efecto del oxígeno se logró observar en la tasa específica de consumo de glucosa (q_S) cuando los valores aumentaron con flujos de aire más altos (de 0.73 g g^{-1} h^{-1} a 0.02 vvm, hasta 1.14 a 0.1 vvm). Las tasas específicas de crecimiento (μ) fueron más bajas en la presencia de aire, con valores $\leq$0.71 h^{-1} mientras que un valor de 0.96 h^{-1} fue alcanzado en la fermentación anaeróbica (Fig. 12). A pesar de que se obtuvieron tasas específicas tanto de crecimiento como de consumo de glucosa más bajas en presencia de aire, esta condición no afectó la dirección de la glucosa hacia la biomasa, ya que se obtuvieron rendimientos de biomasa muy similares para los diferentes tipos de fermentaciones (Tabla 4).

Los coeficientes de producción específica de acetato (q_{Ac}), también se vieron afectados por el oxígeno, cambiando de 0.76 g g^{-1} h^{-1} bajo condiciones anóxicas a 0.3 g g^{-1} h^{-1} en 0.02 vvm, y 0.69 g g^{-1} h^{-1} en 0.06 vvm, disminuyendo con flujos de aire más altos (Fig. 12). q_{Ac} es una medida indirecta de la actividad de las enzimas involucradas en la formación de acetato, de manera que es posible que la enzima acetato cinasa haya sido afectada por el oxígeno. Estos resultados podrían explicar las tasas de crecimiento más bajas obtenidas durante las fermentaciones aireadas ya que la producción de acetato está acoplada a la producción de ATP.

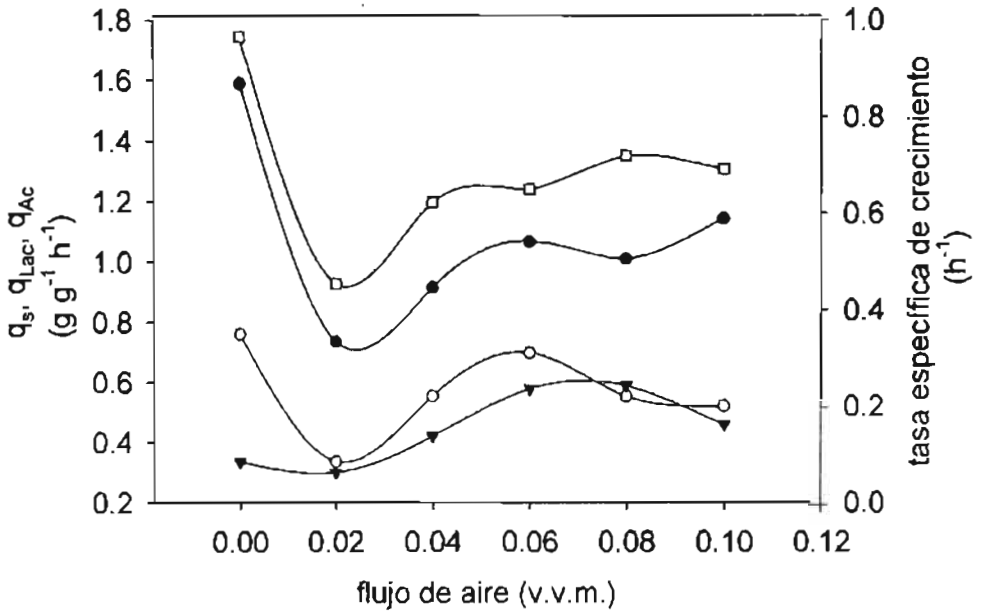

Fig. 12. Parámetros cinéticos en fermentaciones anaerobias y aireadas.
(●)q_s, (□)μ, (o) q_{Ac}, (▼) q_{Lac}

Los coeficientes de producción específica para lactato (q_{lac}) fueron similares para la condición anóxica y de flujo de aire más bajo (0.02 vvm), sin embargo se observó un aumento significativo para este parámetro a flujos de aire más altos, que fueron desde 0.42 a 0.6 g g^{-1} h^{-1} en las condiciones de flujo de aire de 0.04 a 0.08 vvm, con un valor más bajo para la condición de 0.1 vvm (0.46 g g^{-1} h^{-1}) (Fig. 12). La recuperación de carbono a través de la producción de lactato y los rendimientos molares para lactato aumentaron de forma significativa, de 21.1% y 0.43 mmol de lactato por mmol de glucosa bajo condiciones anóxicas a 56.2% y 1.16 mmol mmol^{-1} en la presencia de aire (Tabla 6 y 7).

Podemos notar también, que en los perfiles de q_{Ac} y q_{lac}, se vuelve a presentar un perfil de campana en coincidencia con los perfiles de Q_{O2} y los rendimientos de acetato y lactato.

Los valores más altos de q_{Lac} podrían a su vez, ser indicativos de una activación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Esto se contrapone de algún modo con los resultados obtenidos para *L. lactis*, en donde en presencia de oxígeno se activa la enzima NADH oxidasa y se produce una competencia por NADH entre ésta enzima y LDH, conduciendo a un cambio en el uso del piruvato (Hols y col., 1999). En el caso de *B. infantis*, se consideró a la actividad *in vivo* de la NADH oxidasa a través del valor de Q_{O2}.

Las razones por las cuales se puede estar favoreciendo el flujo de carbono hacia la producción de un metabolito u otro, tiene que ver con los pasos limitantes en una vía metabólica. Uno de estos puntos limitantes es la diversificación del piruvato que va a depender de la inducción y/o activación de las enzimas que lo utilizan como sustrato.

En *E. coli* (Berrios-Rivera y Bennett, 2003) se ha reportado que en condiciones reductoras las células van a preferir utilizar las reacciones en las que se requieran más equivalentes reductores. Para *B. infantis,* éste sería el caso para la condición de anaerobiosis en donde se favorece la vía fosforoclástica ya que al producir etanol, se están utilizando dos moléculas de NADH. En el estudio de *E. coli* anteriormente mencionado, reportan que una concentración más alta de NADH induce la expresión de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH, adhE) una de las enzimas que participan en la producción de etanol; por el contrario condiciones menos reductoras favorecen la producción de lactato ya que únicamente se utiliza una mol de NADH por mol de lactato. De nuevo, para *B. infantis* en el caso de los cultivos aireados utilizados en ésta investigación, las condiciones reductoras son menores que en la condición de anaerobiosis, por lo que coincidiría el aumento de la concentración de lactato con la situación previamente descrita.

En conclusión, el cociente $NADH/NAD^+$ va a determinar en cierta medida el flujo de carbono, por lo que necesariamente se tendrían que estudiar las reacciones donde estos cofactores intervienen, tanto en anaerobiosis como en presencia de aire para *B infantis.*

Otra posibilidad que se ha observado en cuanto al aumento de la concentración de lactato es a través de la activación de la enzima L-LDH por fructosa-1-6-bifosfato. En estreptococos se ha encontrado una correlación entre un exceso o limitación de glucosa, la concentración intracelular de fructosa bifosfato y cambios en la formación de los productos de fermentación. Bajo condiciones limitantes de glucosa el nivel de fructosa bifosfato es muy bajo y se produce principalmente productos de fermentación como acetato, formato y etanol. En cambio en presencia de un exceso de glucosa y altos niveles de fructosa bifosfato, se activa L-LDH y la glucosa se convierte principalmente a lactato(Garmyn y col., 1995).

En la vía del metabolismo de la glucosa en bifidobacterias no se ha encontrado acumulación de fructosa-6-bifosfato, de hecho, éste paso no se considera en ésta vía. Sin embargo, la enzima L-LDH de bifidobacterias se activa por fructosa bifosfato. La enzima responsable de la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa1-6-bifosfato es la fosfofructocinasa, la cual en bifidobacterias se ha detectado en concentraciones bajas. (Rasic y Kurman, 1983).

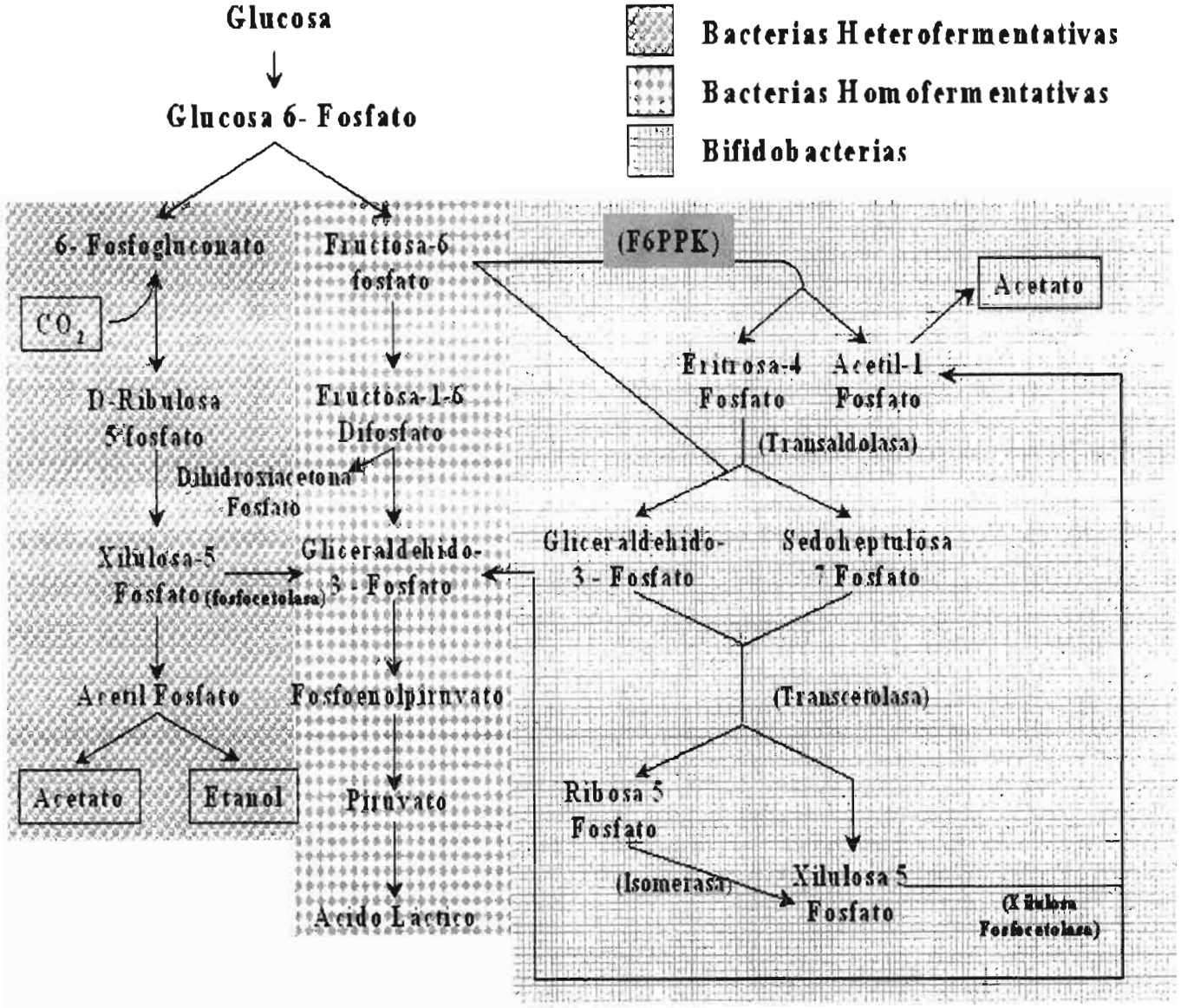

Fig. 13 Comparación de las rutas metabólicas para el metabolismo de glucosa entre bacterias homolácticas, heterolácticas y bifidobacterias.

7.2.6 Determinación de k_La y análisis del sistema de aireación.

Para la determinación del k_La, se realizaron pruebas en el reactor utilizando medio de cultivo sin inocular. Se observó que tanto la absorción de oxígeno (moles de O_2 l^{-1} h^{-1}) como el k_La , aumentaron conforme el aumento de flujo de aire (Fig. 14 y 15). Los valores para K_La en los flujos de 0.02 a 0.05 van de 0.48 a 1.59 h^{-1}. Estos valores de K_La son muy bajos. Para el caso de fermentaciones totalmente aerobias los valores de K_La pueden ser mayores a 100 h^{-1}, los reportes con valores de k_La para sistemas microaerobios sin embargo, son escasos.

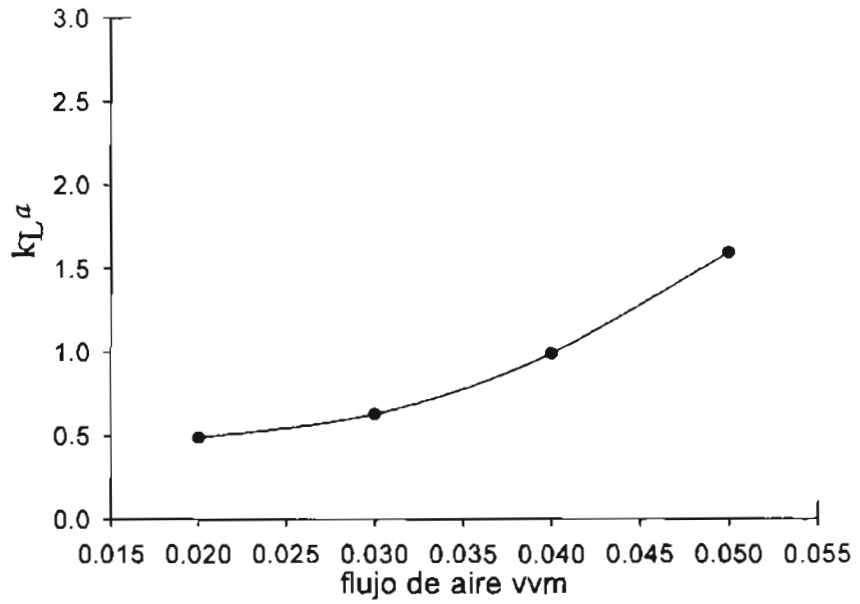

Fig. 14. Valores de k_La a diferentes flujos de aireación. Pruebas realizadas en medio de cultivo TPYG sin células.

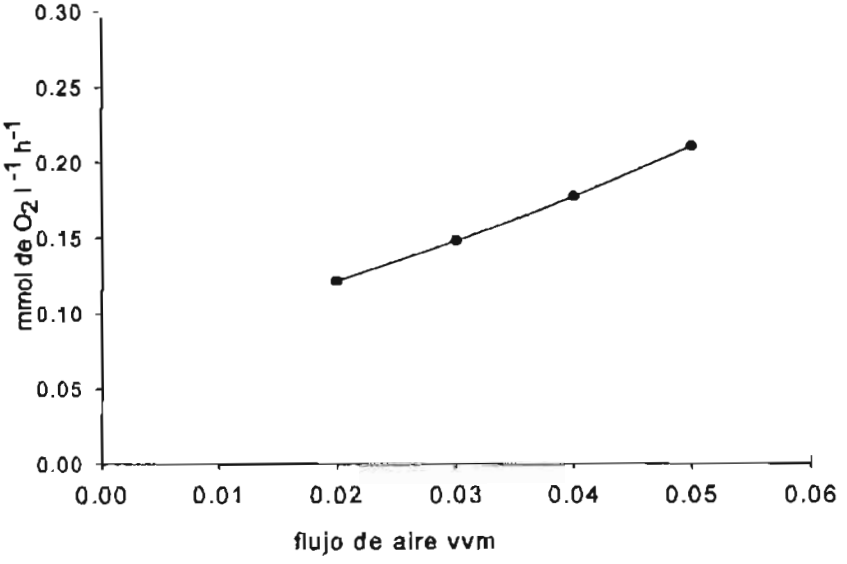

Fig. 15. Absorción de oxígeno a diferentes flujos de aireación. Pruebas realizadas en medio de cultivo TPYG sin células.

En el caso de microorganismos anaerobios facultativos como *Lactobacillus sake*, *Propionibacterium shermanii* o *Leuconostoc mesenteroides* se ha estudiado también el efecto del oxígeno en su metabolismo en fermentaciones aireadas donde los valores de k_La se han reportado en el rango 4.8 hasta 53 h^{-1} (Amanatidou y col., 2001; Plihon y col., 1995; Quesada y col., 1998; Azaola y col., 2004). Quesada y col., (1998) reportan valores de k_La como "bajos" en el rango de 10 y 22 h^{-1} para la producción de vitamina B_{12} en *Propionibacterium shermanii* un microorganismo anaerobio facultativo; en este estudio a esos valores de k_La el microorganismo consumía todo el oxígeno transferido, por lo que el nivel de oxígeno disuelto fue de cero hasta las 16 horas del cultivo.

Como ya se discutió, *B. infantis* logró crecer aún en la condición donde el flujo de aireación fue más alto (0.1 vvm) por lo que seguramente *B. infantis* todavía podría crecer a valores de k_La más altos, sin embargo es difícil determinar con los datos obtenidos cual

sería el límite de resistencia. En los microorganismos aerobios se puede determinar lá demanda de oxígeno y en base a eso tener un parámetro para establecer el k_La en el reactor, situación diferente para microorganismos microaerofílicos, anaerobios facultativos y aún mas en anaerobios estrictos, a los que hay que ir suministrando concentraciones crecientes de oxígeno hasta observar donde el microorganismo ya no es capaz de crecer o donde una variable de respuesta cambia de manera significativa, sin embargo, esta diferencia podría darse en un rango muy pequeño entre una concentración de oxígeno no limitante y una limitante.

En esta investigación con *B. infantis*, los resultados obtenidos en relación a los diferentes flujos de aireación mostraron entre si diferencias que fueron difíciles de correlacionar, por lo que la discusión se centró mayormente en la comparación de la condición anaerobia con respecto a las condiciones aireadas, donde de forma global se pudieron notar diferencias en el metabolismo utilizando aire, y se pudo obtener un aproximado sobre la capacidad de absorción de oxígeno de *B. infantis*.

7.2.7 pH.

En la fermentación anaerobia, el pH disminuyó en coincidencia con el crecimiento llegando a aproximadamente a un pH de 4.25 a las 5 horas del cultivo, la disminución del pH se dio desde la primera hora. En las condiciones aireadas, durante las primeras tres horas el pH prácticamente se mantuvo, retrasando su caída hasta aproximadamente la cuarta hora de fermentación; el valor de pH alcanzado por estas fermentaciones fue entre 4.5 y 4.7 a las 6 horas (Apéndice 2). Como ya mencionamos anteriormente el CO_2 al disolverse en el medio, forma ácido carbónico, lo que contribuye a su acidificación, es posible que al aplicar aire, el CO_2 se desplazara, revirtiendo esta situación. Es posible

también, que este efecto amortiguador en las primeras horas del cultivo, haya contribuido a que el microorganismo resistiera las condiciones de estrés por el oxígeno, y así alcanzar una mayor tolerancia.

CAPITULO VIII. CONCLUSIONES

En cuanto al objetivo de establecer las condiciones de crecimiento en condiciones de anaerobiosis y en presencia de oxígeno, se encontró:

1. Una buena opción para crear el ambiente anaerobio fue con CO_2 de alta pureza (99%) ya que cuando se utilizó nitrógeno para saturar el medio de cultivo en el reactor, no se obtuvo crecimiento de *B. infantis*.
2. En el sistema de fermentación diseñado, donde inicialmente se inoculó a *B. infantis* en un ambiente de CO_2, e incorporando gradualmente el oxígeno con flujos de aire bajos; el microorganismo creció con rendimientos de biomasa similares a la condición anaerobia.
3. La aero-tolerancia que alcanzó el microorganismo fue alta ya que soportó concentraciones de OD de hasta un 80% durante la fase exponencial.

En cuanto al efecto del oxígeno en la formación de productos de fermentación de glucosa se encontró:

4. En condiciones aireadas, el flujo de carbono se favorece hacia la producción de lactato donde, la concentración de este metabolito se vio aumentada al doble de la producida en condiciones anaerobias. En cambio la vía fosforoclástica se inhibe, ya que la concentración de formato en presencia de aire disminuye de manera significativa.
5. Este estudio contribuye al conocimiento del efecto del oxígeno en el crecimiento de *B. infantis* y en la formación de productos del metabolismo de glucosa, abriendo la posibilidad de manipular las condiciones de fermentación para obtener un balance en la relación acetato:lactato, así como para obtener buen crecimiento bajo condiciones de aireación controladas.

CAPITULO IX. RECOMENDACIONES

1. Es importante continuar con la investigación sobre el efecto del oxígeno en la enzimas involucradas en la asimilación del oxígeno: NADH oxidasa y NADH peroxidasa, así como en algunas enzimas del metabolismo de glucosa tales como: acetato cinasa y lactato deshidrogenasa.
2. Estudios sobre la regulación en la expresión de las enzimas mencionadas en ausencia y presencia de oxígeno.
3. Continuar con el estudio en cuanto al diseño de sistemas fermentación que permitan cuantificar el efecto del oxígeno en microorganismos anaerobios aero-tolerantes.
4. El estudio de la función del CO_2 en las bifidobacterias, podría también abrir una línea de investigación importante con respecto tanto a su fisiología, como a las condiciones óptimas de crecimiento de estos microorganismos.
5. Este sistema de fermentación podría ser útil para el estudio de otros microorganismos anaerobios aero-tolerantes, se propone realizar la determinación del Q_{O2} y usarlo como un parámetro para comparar aero-tolerancias entre microorganismos.
6. La búsqueda de cepas aero-tolerantes para aumentar el uso de especies de bifidobacterias en los productos probióticos.

REFERENCIAS

- Ahn, J.B., Hwang H.J., y J. H. Park. 2001. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(3):443-451.

- Amanatidou A., Smid E. J., Bennik M. H. J., y L G. M. Gorris. 2001. Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. *FEMS Microbiol. Lett.* 203:87-94.

- Azaola A., Blancas A., Barranco E., González R., Mayorga L.. 2004. Determinación del coeficiente respiratorio QO_2 de *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* ATCC 13673. En: XXX Aniversario de la Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. Vol. II. México, D.F.

- Baughn A. D. Y M. H. Malamy. 2004. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature* 427:441-444.

- Beerens H., Gavini F., and C. Neut. (2000). Effect of exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. *Anaerobe* 6:65-67.

- Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R. and A. L. Servín. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(12):4121-4128.

- Berrios-Rivera S., San K-Y y E. N. Bennett, 2003. The effect of carbon sources and lactate dehydrogenase deletion on 1,2, propanediol production in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:34-40.

- Bezkorovainy A., and R. Miller-Catchpole. (1989). Ecology of bifidobacteria. In:Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria; CRC Press: Boca Raton, Fl. Pp 29-72.

- Biabati B. and P. Mattarelli. (1991). *Bifidobacterium ruminatum* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1):163-168.

- Boga H. I., y A. Brune. 2003. Hydrogen-Dependent oxygen reduction by homoacetogenic bacteria isolated from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:779-786.

- Bringel, F. y Hubert, JC, 2003. Extent of genetic lesions of the Arginine and Pirimidine biosynthetic pathway in *Lactobacillus plantarium, L. paraplanarum, L. pentosus,* and *L. casei*: Prevalence of CO_2^- Dependent auxotrophs and characterization of deficient *arg* genes in *L. plantarum. Appl. Environ. Microbiol.* 69:2674-2683

- Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:269-280.

- Corre, M. N. Madec y P. Boyaval. 1992. Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum. J. Chem. Tech. Biotechnol.* 53:189-194.

- Cox R. P., y N. Marling. 1992. High affinity oxygen uptake by *Bifidobacterium bifidum. Antonie van Leeuwenhoek* 62: 291-297.

- Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C. and V. Scardovi. 1996. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (2):564-571.

- Chevalier P., Roy D. Y P. Ward. 1990. Detection of *Bifidobacterium* species by enzimatic methods. *J Appl. Bacteriol.* 68:619-624.

- Degnan B. A., y G. T. Macfarlane. 1994. Effect of dilution rate and carbon availability on *Bifidobacerium breve* fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:800-805.

- De Vries W., y A. H. Stouthamer. 1968. Fermentation of Glucose, Lactose, Galactose, Mannitol, and Xylose by Bifidobacteria. *J. Bacteriol.* 96: 472-478.

- De Vries W. and A.H. Stouthamer. (1969). Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Mikrobiol.* 65: 275-287.

- Desjardins M., D. Roy and C. Toupin. (1990). Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium ssp. J. Dairy Sci.* 73:1478-1484.

- Elmer, G.W., Surawics C.M., y McFarland, L.V.1996. Biotherapeutic Agents: A Neglected Modality for the Treatment and Prevention of Selected Intestinal and Vaginal Infections. *JAMA*, 275(11):870-876.

- Fabrice, P., Pascale P., Martine Ch., Francis B., Khaled M., y J. Menanteau. 1997. Short-Chain Fructo-oligosaccharides Reduce the Ocurrence of Colon Tumors and Develop Gut-associated Lymphoid Tissue in *Min* Mice. *Cancer Research* 57, 225-228.

- Fuller, R. (Ed.) 1992. Probiotics, the Scientific Basis. Chapmann & Hall, London, pp. 209-224.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO

- Garmyn D, Ferain T., Bernard N., Hols, P. Y J. Delcour. 1995. Cloning, Nucleotide Sequence, and Transcriptional Analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-Lactate Dehydrogenase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:266-272.

- Gibson G.R., and Roberfroid M.1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of Prebiotics. *The J. of Nutrition* 125(6):1401-1412.

- Gismondo M. R., Drago L. and A. Lombardi. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrobial Agents* 12:287-292.

- Grill, J.P., Manginot-Dür, C., Schneider, F., Ballongue J. 1995a. Bifidobacteria and Probiotic Effects: Action of *Bifidobacterium* Species on Conjugated Bile Salts. *Current Microbiol.* 31:23-27.

- Grill, J.P., Schneider, F., Crociani, J., y Ballongue, J.1995b. Purification and Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl. and Eviron. Microbiol.* 61(7):2577-2582.

- Havenaar, R., Brink T., y J. H. J. Huis in't Veld. 1992. En: Fuller, R. (Ed.) Probiotics, the Scientific Basis. Chapmann & Hall, London, pp. 209-224.

- Hols P., Ramos A., Hugenoltz J., Delcour J., De Vos W. M., Santos H., y M. Kleerebezem. 1999. Acetate utilization in Lactococcus lactis deficient in lactate dehydrogenase: a rescue pathway for maintaining redox balance. *J Bacteriol.* 181:5521-5526.

- Jenney F.E.; Verhagen. J.M., Cui X., y M.W. W. Adams. 1999. Anaerobic Microbes: Oxygen Detoxification without Superoxide Dismutase. *Science* 286: 306-309.

- Jensen, B. N. S., Melchiorsen, C. R., Jokumsen, K. V. and J. Villadsen. (2001). Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate. *Appl.Environ. Microbiol.* 67(6):2677-2682.

- Jiang T., Mustapha A., y D.A. Savaiano. 1996. Improvement of Lactose Digestion in Humans by Ingestion of Unfermented Milk Containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* 79:750-757.

- King K. Y., Horenstein J. A., y M. G. Caparon. 2000. Aerotolerance and Peroxide Resistance in Peroxidase and PerR Mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 182:5290-5299.

- Krause L.J., Forsberg Cecil W., y O'Connor D. 1996. Feeding Human Milk to Rats Increases *Bifidobacterium* in the Cecum and Colon Which Correlates with Enhanced Folate Status. *The J. of Nutr.* 126(5):1505-1511.

- Lauer E., y Kandler O. 1976. Mechanism of the Variation of the Acetate/Lactate Ratio during Glucose Fermentation by Bifidobacteria. (Mechanisms der Variation des Verhältnisses Acetat/Lactat béi der Vergärung von Glucose durdh Bifidobakterien). *Arch. Microbiol.* 110:271-277.

- Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. y D. Van Sinderen. 2005. Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98:1303-1315.

- Lim D. 1998. Microbiology. WCB/McGrawHill. Boston, Massachusetts. Pp. 93-94.

- Matsumoto J., Masako H., Shimada M., Yamamoto Y., y Y. Kamio. 1996. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the H_2O-forming NADH oxidase from *Streptococcus mutants*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:39-43.

- Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., and M. Saarela(2002).Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12:173-182.

- Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufmann P., Dasen G., Wenger S. and M. Tueber. (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.* 20:57-64.

- Neves A R., Ramos A., Costa H., van Swam I., Hugenholtz J., Kleerebezem M., de Vos W. Y H. Santos. 2002. Effect of Different NADH Oxidase Levels on Gucose Metabolism by *Lactococcus lactis*; Kinetics of Intracellular Metabolite Pools Determined by In Vivo Nuclear Magnetic Resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6332-6342.

- Nishiyama Y., Massey V., Takeda K., Kawasaki S., Sato J., Watanabe T., y Y. Niimura. 2001. Hydrogen Peroxide-Forming NADH Oxidase Belonging to the Peroxiredoxin Oxidoreductase Family: Existence and Physiological Role in Bacteria. *J. Bacteriol.* 183:2431-2438.

- Parés R. Y Juárez A. 2002 Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España.

- Passerat, B., y Desmaison a.M., 1995. Lactase Activity of *Bifidobacterium bifidum*. *Nutrition Research*, 15(9):1287-1295.

- Pirt, J.S. 1975 Principies of Microbe and Cell Cultivation, pp 156-158 Blackell, Scientific Publications, London.

- Plihon F., Taillandier P., y Strehaiano P. 1996. Oxygen effect on lactose catabolism by a Leuconostoc mesenteroides strain: Modeling of general O_2-Dependent stoichiometry. *Biotehnol. Bioeng.* 49:63-69.

- Poupard, J.A., Hausain, Y. y Norris, R.F. 1973. Biology of Bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.* 37: 136-165

- Quesada-Chanto, A., Schmid-Meyer A.C., Schroeder A.G., Carvalho-Jonas M. F., Blanco I. y R. Jonas. 1998. Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin B_{12} production by *Propionibacterium shermanii*. *World J. Microbiol and Biotechnol.* 14:843-846.

- Rasic J. Lj., y J. A. Kurmann. 1983. Bifidobacteria and Their Role. Microbiological, Nutritional-Physiological, Medical and Technological Aspects and Bibliography. (Fermented fresh milk products and their cultures; Vol. 2) (Experientia: Suppl. Vol 39). Ed. Birkhäuser, Basel, Boston, Stuttgart.

- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria:safety, functional and technological properties. *J. Biotech.* 84, 197-215.

- Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung, Y., Perman J.A., y Yolken R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet* 344(Oct):1046-1049.

- Sakamoto M. y K. Komagata. 1996. Aerobic Growth and Activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *J. Ferm Bioeng.* 82(3):210-216.

- Sanders, M. E. 1993. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. *J. Dairy Sci.* 76:1819-1828.

- Sauer, V., D. Lasko, J. Fraux, M. Hochuli, R. Glaser, T. Szypenski, K. Wüthrich y J.E.Bailey 1999. Metabolic flux ratio analysis of genetic and enviromental modulations of *E. coli* central carbon metabolism. *J. Bacteriol.* 181: 6679-6688.

- Sawers G.and A. Bock. (1988). Anaerobic regulation of pyruvate-formate lyase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170:5330-5467.
- Scardovi V. y L. D. Trovatelli, 1965. The fructose-6-P shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzymol.* 15:19-29.

- Schell M. A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen MC., Desiere F., Pridmore R. D., y F. Arigoni. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl.Acad. Sci.* USA 99(22):14422-14427.

- Secretaría de Salud. (2001). Enfermedad Diarreica en Niños. Boletín Práctica Médica Efectiva 3 (6). Available in: http:/bvs.insp.mx.

- Seeliger S.k, Janssen H., y B. Schink. 2002. Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol Lett.* 211:65-70.

- Shimamura S., Abe F., Ishibashi N., Miyakawa H., Yaeshima T., and M. Tomita. (1990). Endogenous oxygen uptake and polysaccharide accumulation in Bifidobacterium. *Agric. Biol. Chem.* 54:2869-2874.

- Shimamura S., Abe F., Ishibashi N., Miyakawa H., Yaeshima T., Araya T. and M. Tomita. (1992). Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.* 75:3296-3306.

- Simpson P. J., Ross P. R., Fitzgerald G. F. y C. Stanton. 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:401-406.

- Smith K., y Ferry J. G. 2000. Prokaryotic corbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:335-366.

- Stansbury P. F. y A. Whitaker 1984. En: Principles of Fermentation Technology. Capítulo 9: Aeration and Agitation. P. 169-190. Pergamon Press 255 pp

- Tahri, K., Grill, JP y F. Schneider. 1996. Bifidobacteria Strain Behavior Toward Cholesterol: Coprecipitation with Bile Salts and Assimilation. *Curr. Microbiol.* 33:187-193.

- Talwalkar A. y K. Kailasapathy. 2003. Metabolic and Biochemical Responses of Probiotic Bacteria to Oxygen. *J. Dairy Sci.* 86:2537-2546.

- Uesugi I and Yamija M. (1978). Oxygen and "strictly anaerobic" bacteria I. Effects of dissolved oxygen on growth. *Z. Allg. Mikrobiol.* 18:287-295.

- Venturin Ch, Boze H., Moulin G. and P. Galzy. 1995. Influence of oxygen limitation on glucose metabolism in *Hanseniaspora uvarum* K5 grown in chemostat. *Biotechnol. Lett.* 17:537-542.

- Wolin J.M., Zhang Y., Bank S., Yerry S. and T.L. Miller. (1998). NMR detection of $^{13}CH_3{}^{13}COOH$ from 3-^{13}C-Glucose: A signature for *Bifidobacterium* fermentation in the intestinal tract. *J. Nutr.* 128:91-96.

- Yasui H., Kiyoshima J., y Ushijima, H. 1995. Passive Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea of Mouse Pups Born to and Nursed by Dams Fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *J. of Infect. Dis.* 172:403-9.

APÉNDICES

Apéndice 1. Viabilidad de *B. infantis* en el inóculo.

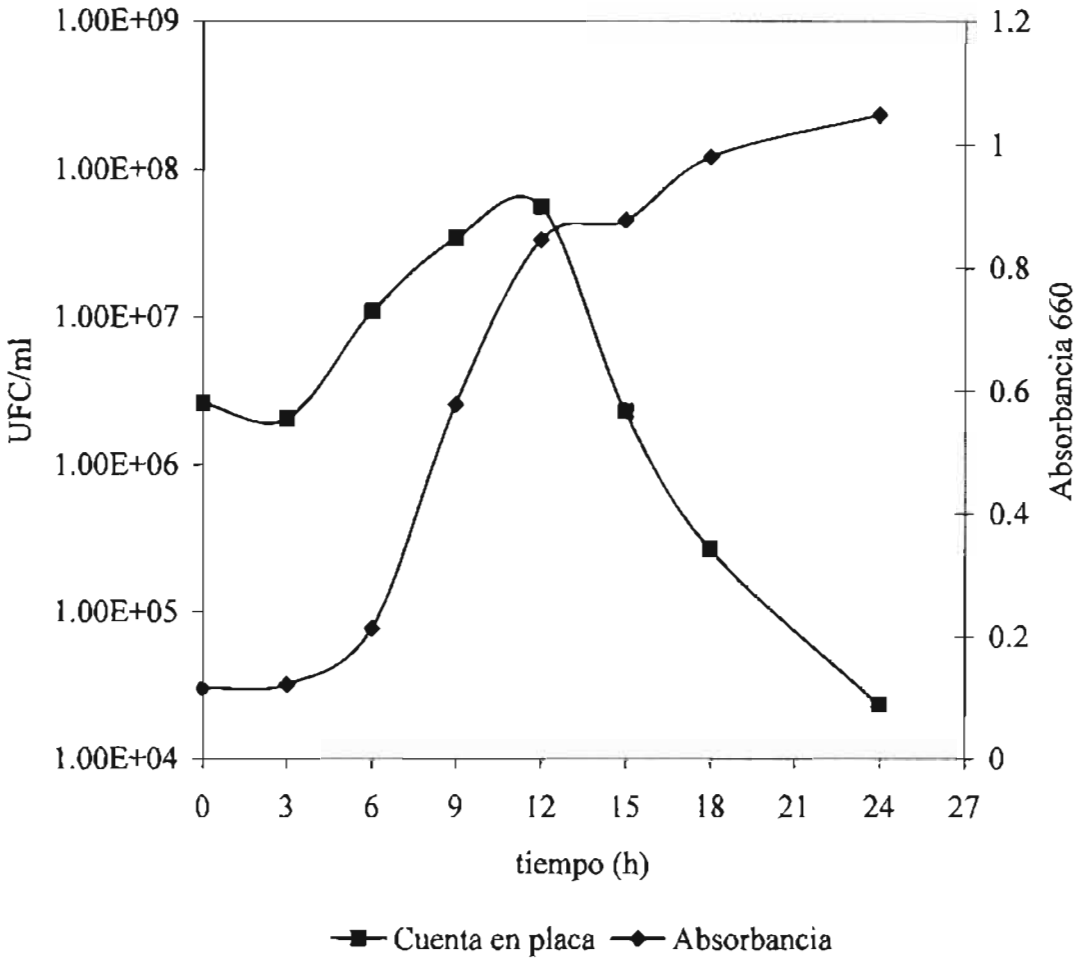

Fig. A.1. Comparación del perfil de UFC/ml contra absorbancia, para cuantificar el crecimiento de *B. infantis* en medio TPYG, crecido en botellas de suero de un litro y burbujeadas con CO_2 de alta pureza. Este cultivo se utilizó como inóculo para las fermentaciones en el reactor.

Apéndice 2. Comportamiento del pH en fermentaciones anaerobia y aireadas.

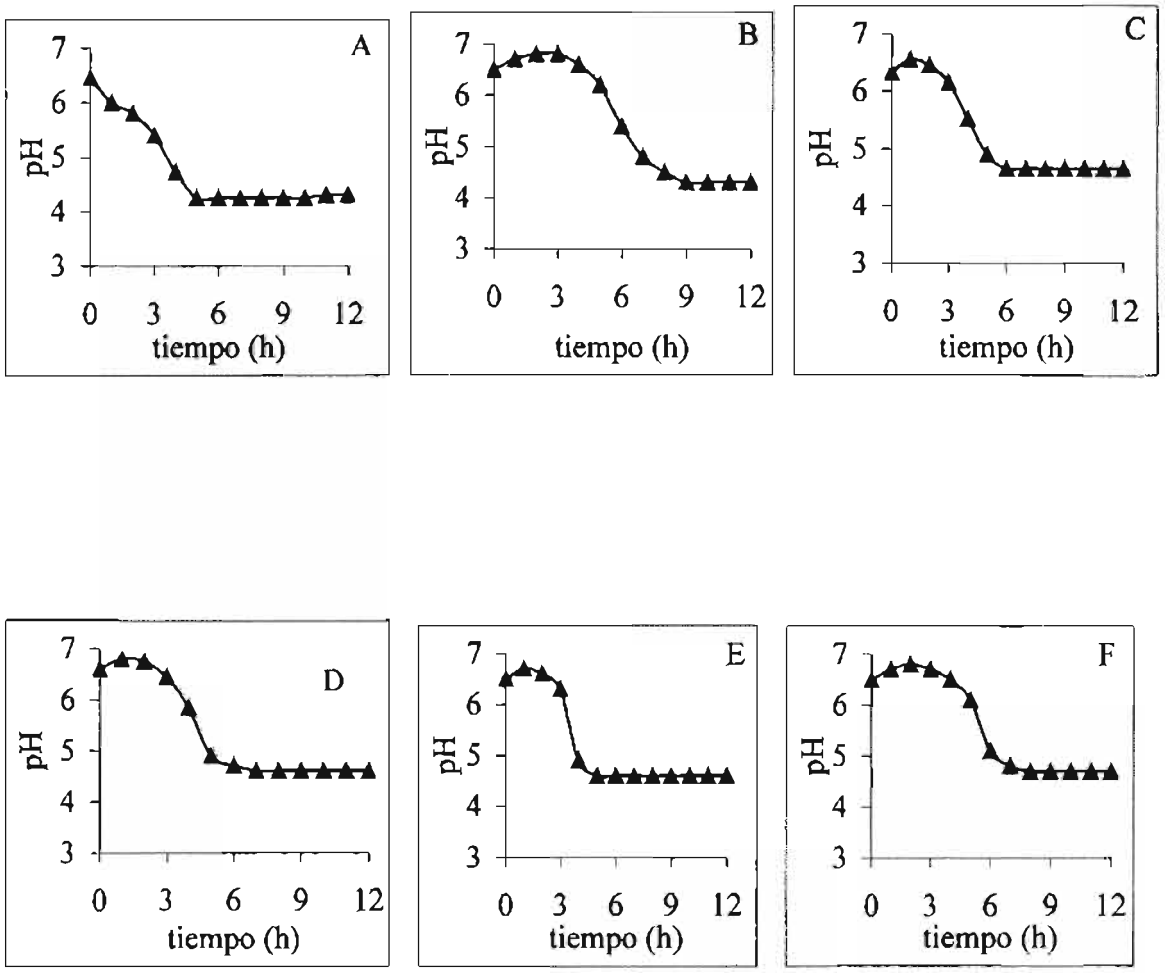

Fig. A.2. Perfiles de pH en condiciones anaerobias y aireadas. Anaerobiosis (A); Fermentaciones Aireadas (flujo de aire, en v.v.m.: volumen de aire por volumen de líquido por minuto): 0.02 (B), 0.04 (C), 0.06 (D), 0.08 (E) y 0.1 (F).

Appl Microbiol Biotechnol (2004) 65: 606–610
DOI 10.1007/s00253-004-1603-9

APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY

R. González · A. Blancas · R. Santillana · A. Azaola · C. Wacher

Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations

Received: 3 September 2003 / Revised: 18 February 2004 / Accepted: 28 February 2004 / Published online: 14 April 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Fermentation conditions were developed to allow *Bifidobacterium infantis* to grow in the presence of air. Batch fermentations in TPYG medium, starting from anoxic conditions followed by the application of low airflow rates [0.02–0.1 air volume, per liquid media volume, per minute (vvm)], were analyzed for growth, oxygen uptake, and product formation by the bacterium. Under all aerated fermentations, *B. infantis* showed high aerotolerance, with a maximum oxygen-specific consumption rate of 0.34 mmol oxygen per gram dry cell weight per hour in the presence of 0.06 vvm. Similar growth yields were obtained under oxic and anoxic conditions (0.11–0.13 and 0.11 g dry cell weight per mmol glucose, respectively). Oxygen also influenced metabolite formation since lactate production and its molar relation to acetate increased and formate decreased with aeration rate. Under anoxic conditions, a maximum concentration of 8.1 mM lactate and an acetate/lactate ratio of 3.5:1 were obtained, while under oxic conditions the lactate concentration increased more than two-fold and the acetate/lactate molar ratio decreased to 1.5:1. The possibility of balancing acetate/lactate molar ratios for organoleptic purposes as well as for obtaining good growth under microaerated conditions was demonstrated.

R. González (✉) · A. Azaola
Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco,
Apartado postal 23-181,
Mexico, 16000, Mexico
e-mail: gcrm4280@correo.xoc.uam.mx
Tel.: +52-55-5483-7376
Fax: +52-55-5483-7237

A. Blancas
Planta Piloto, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM,
Ciudad Universitaria,
Coyoacán,
Mexico, 04510, Mexico

R. Santillana · C. Wacher
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria,
Coyoacán,
Mexico, 04510, Mexico

Introduction

Bifidobacteria are gram-positive bacteria that inhabit the intestinal tracts of both humans and animals and are commonly used in the preparation of probiotic products (Beskorovainy and Miller-Catchpole 1989). The oral ingestion of these microorganisms produces a protective effect on the gut flora (Gismondo et al. 1999). *Bifidobacterium infantis* is a strain of infant gastrointestinal tract origin that has been shown experimentally to participate in competitive exclusion against diarrheagenic bacteria (Bernet et al. 1993). Diarrheal disorders are among the causes of the high infant and child morbidity and mortality rates in Mexico (Secretaría de Salud 2001), therefore the manufacture of probiotic products with this particular species is of great interest. One of the technological aspects to be considered in probiotic selection is the viability of the microorganisms during processing (Mattila-Sandholm et al. 2002), and among the significant factors affecting the viability of bifidobacteria is oxygen. *Bifidobacterium* species have been applied in the manufacture of dairy and pharmaceutical products but, since *Bifidobacterium* possess neither a respiratory chain nor catalase, it is generally considered strictly anaerobic; hence, oxygen toxicity is an important problem when bifidobacteria are cultivated for industrial applications. However, some strains are considered moderately aerotolerant, since they survive in the presence of air (De Vries and Stouthamer 1969; Uesugi and Yamija 1978; Meile et al. 1997; Beerens et al. 2000; Talwalkar et al. 2001). Shimamura et al. (1990, 1992) showed that *B. infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium adolescentis* are able to consume O_2 and found that these strains have NADH oxidase, NADH peroxidase, and low superoxidase dismutase activities which minimize the toxicity of activated oxygen com-

pounds. These enzymes also operate in lactic acid bacteria, which are considered facultative anaerobes, although some strains grow well under oxic conditions. This ability has been linked to a shift in the carbohydrate metabolism of these microorganisms in response to oxygen (Condon 1987). In a recent study, Talwalkar and Kailasapathy (2003) found a change in the metabolic response of four *Bifidobacterium* spp. to different oxygen environments such that the lactate to acetate ratio of the bacteria decreased with an increase in oxygen percentage. It can be concluded that aerotolerance differs for each strain of bifidobacteria; therefore, it is necessary to test the oxygen resistance of the particular probiotic microorganism to be utilized and to investigate whether this resistance is coupled to a change in carbohydrate metabolism. The objective of the present work was to determine the effect of oxygen on growth and main product formation (acetate, lactate, and formate) by *B. infantis*.

Materials and methods

Strain

B. infantis ATCC 17930 was maintained at −70°C in a mixture of 20% glycerol and 10% skimmed milk powder (Oxoid).

Inocula

A volume of 10 ml modified MRS broth (Desjardins et al. 1990) was inoculated with 1 ml of the stock culture and incubated in an anoxic jar with a Gaspack system (Oxoid) at 37°C for 24 h. This culture was transferred to a 1-l serum bottle sealed with a rubber stopper and containing 1,000 ml TPYG medium (g l^{-1}: glucose 5; casein peptone 10; soy peptone 5; yeast extract 2.5; cysteine 0.5; K_2HPO_4 2; $MgCl_2$ 0.5; $ZnSO_4$ 0.25; $CaCl_2$ 0.15; $FeCl_3$ 0.005; and 1 ml Tween 80) previously degassed with high-purity CO_2. The culture was incubated at 37°C in an orbital incubator shaker at 200 rpm for 12 h and harvested at mid-exponential growth phase to inoculate the reactor in a 10% (v/v) proportion.

Fermentation conditions

Ten l TPYG medium were fermented in a 16-l stirred reactor (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA). For anoxic conditions, oxygen was displaced from the sterile medium by sparging high-purity CO_2 until the dissolved oxygen percentage relative to saturation with air (% DO) was zero. The medium was then inoculated and a constant CO_2 flow rate of 200 ml min^{-1} was maintained throughout the fermentation. For different aerated conditions, 0% DO was attained using the previous procedure, the CO_2 flow was then shut off, the medium was inoculated ,and a constant airflow in vvm units (air volume, per liquid media volume, per minute), controlled by a rotameter (Gilmont instruments, Great Neck, N.Y., USA), was supplied in a range between 0.02 and 0.1 vvm. In all cases the medium pH was adjusted to 6.5 after inoculation using sterile 10 N NaOH. All fermentations were carried out at 37°C and stirred at 100 rpm. pH and saturated % DO were constantly monitored using a glass pH-electrode (Mettler-Toledo, Process Analytical, Mass., USA) and a galvanic dissolved oxygen electrode (New Brunswick Scientific), respectively. Experiments were done in duplicate.

Analytical methods

Hourly samples were withdrawn and analyzed as follows: cell concentration was monitored by measuring the optical density at 660 nm. Cell dry weight was determined by filtering 3-ml samples through 0.45-μm nitrocellulose filters, washing with 10 ml distilled water and drying to constant weight at 50°C. A correlation between optical density and dry weight was obtained. A portion of each sample was centrifuged (8,000 *g* for 15 min at 4°C), and the supernatant was stored at −20°C for subsequent chromatographic analyses. Glucose and fermentation products (acetate, lactate, and formate) were analyzed by high-pressure liquid chromatography (Perkin Elmer Isocratic LC Pump 250) with Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Richmond, Calif., USA) at room temperature with a 0.6 ml min^{-1} flow using H_2SO_4 (0.01 N) as eluent and a Perkin Elmer LC-30 refractive index detector.

Parameters estimation

Specific growth rate (μ: h^{-1}) was estimated during the exponential growth phase by linear regression of ln X/X_0 (dry cell weight) vs time. Growth and product yields ($Y_{x/s}$ g dry cell weight (dcw) per mmol glucose consumed and $Y_{p/s}$ mmol product per mmol glucose consumed, respectively) were calculated as the ratio between either biomass or product (acetate, lactate, or formate) produced and consumed substrate. Specific rates of acetate and lactate formation (g product per g dcw per h), were calculated as $\mu/Y_{x/p}$ (Pirt 1975), where $Y_{x/p}$ is the biomass yield referred to product formed (g dcw per g product). Specific oxygen consumption rate (Q_{O2}) was calculated as mmol oxygen per g dcw per h, from an oxygen balance, where dC_L/dt is equal to the oxygen supplied minus that consumed: $dC_L/dt = Kla(C^* - C_L) - Q_{O2}X$; considering C^* as 0.25 mM; (C_L=concentration of the dissolved gas in mM, C^*=saturation value of the dissolved gas in the phase boundary, Kla is the volumetric oxygen transfer coefficient, h^{-1}).

Results

Growth and oxygen consumption by *B. infantis*

High-purity CO_2 was used to create an anoxic environment. In aerated fermentations, *B. infantis* cells were able to grow when the airflow was injected after the inoculation. Growth curves and % DO under anoxic and aerated conditions of 0.02–0.1 vvm are shown in Fig. 1. In aerated fermentations, the % DO curve rapidly increased during the first hour and slowed down when the culture entered the exponential growth phase. Maximum oxygen consumption by the microorganism occurred in the mid-exponential growth phase during which the % DO curve declined (Fig. 1b–f). Under these conditions, the microorganism was able to support growth to the same extent as in the anoxic environment (Fig. 1a). In all aerated conditions, oxygen uptake stopped as growth ceased and the % DO increased again by the time the culture entered the stationary phase. This confirms oxygen assimilation by the microorganism. Starting aerated fermentations from 0% DO apparently permitted progressive oxygen incorporation, allowing *B. infantis* to support oxygen concentrations as high as 80% DO (Fig. 1f). The decline in % DO (Fig. 1b–f) corresponded to the cellular capacity for oxygen uptake. The actual specific oxygen consumption rates (Q_{O2}: mmol oxygen assimilated per g dcw per h)

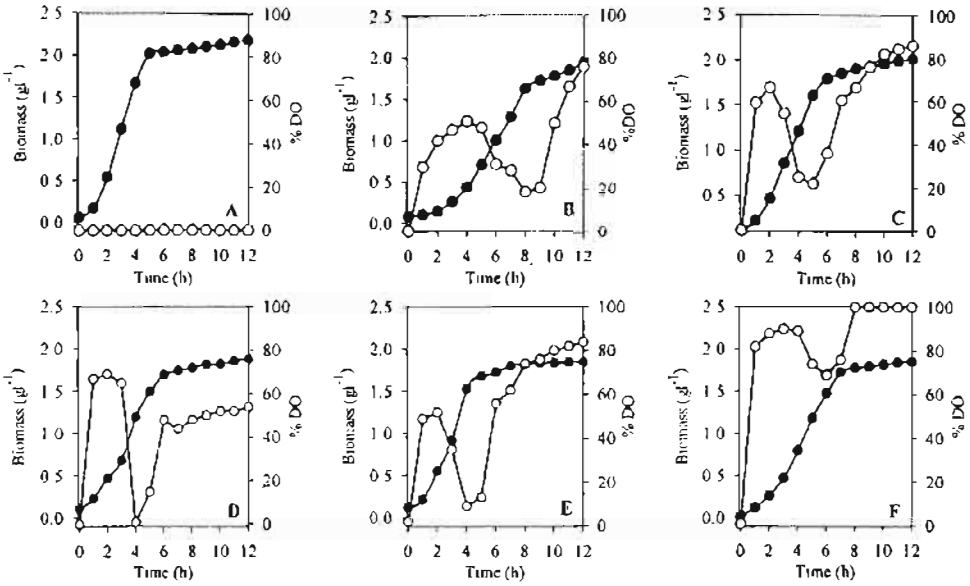

Fig. 1 Growth (*filled circles*) and % DO (percentage of dissolved oxygen) (*open circles*) under anoxic and aerated conditions. **a** Anaerobic, aerated fermentations (airflow, in vvm: air volume per liquid volume per min): **b** 0.02, **c** 0.04, **d** 0.06, **e** 0.08, **f** 0.1

increased from 0.02 to 0.34 mmol O_2 g^{-1} h^{-1} with airflows from 0.02 to 0.06 vvm, respectively, and values decreased with higher airflow rates (Table 1).

Aeration effect on biomass and metabolite production

Biomass concentration of *B. infantis* was lower in aerated than in anaerobic fermentation; however, all biomass yields were similar (Table 1). Aeration did not prevent glucose fermentation since the main metabolites from the bifidus pathway were produced. The anoxic condition yielded 3:1 acetate/lactate molar ratio, as has been previously reported for bifidobacteria (Wolin et al. 1998). The acetate/lactate molar ratio changed to an average of 1.8:1 in all aerated fermentations (Table 2).

Slight variations in acetate concentrations and acetate molar yields were observed in that acetate production in the aerated fermentations at 0.04 and 0.06 vvm was similar to that under anoxic conditions, but at 0.02, 0.08, and 0.1 vvm it was lower (Table 2). In contrast, lactate production (Table 2) was considerably higher in the presence of air, increasing more than two-fold at 0.06 and 0.08 vvm compared to the level in the anaerobic culture. Lactate molar yield values were also at least two-fold higher when airflows were applied and, consequently, acetate/lactate ratios decreased (Table 2). Under aerated conditions, 19–35% more carbon was recovered as lactate than in the anaerobic fermentation (Table 2). Formate production was practically nil in the presence of air, while *B. infantis* grown under anoxic conditions accumulated 5.3 mM of this metabolite.

Fermentation kinetics of anoxic and aerated conditions

The glucose consumption rate (q_s) was higher in the anaerobic (1.6 g glucose per g dcw per h) than in the aerated fermentation (Fig. 2), but an effect of oxygen on the glucose specific consumption rate was observed in that q_s values increased with higher airflows (0.73 g g^{-1} h^{-1} at 0.02 vvm, to 1.14 g g^{-1} h^{-1} at 0.1 vvm). Specific growth rates (μ) were lower in the presence of air, with values $\leq$0.71 h^{-1} whereas a value of 0.96 h^{-1} was reached in the anaerobic fermentation (Fig. 2).

Specific acetate production coefficients (q_{Ac}) were also affected by aeration, changing from 0.76 g g^{-1} h^{-1} under anoxic conditions to 0.3 g g^{-1} h^{-1} at 0.02 vvm, and 0.69 g g^{-1} h^{-1} at 0.06 vvm, and decreasing with higher airflows. Specific lactate production coefficients (q_{Lac}) were similar for the anoxic and lowest airflow (0.02 vvm) condition, but a significant rise in this parameter occurred at higher airflow rates, from 0.42 to 0.6 g g^{-1} h^{-1} at 0.04–0.08 vvm, and a lower value at 0.1 vvm (0.46 g g^{-1} h^{-1}).

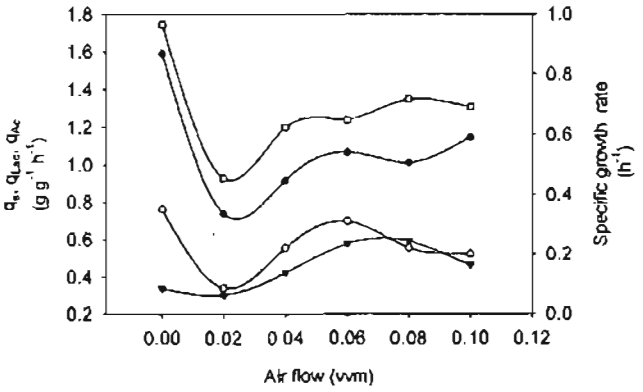

Fig. 2 Kinetic parameters of anaerobic and aerated fermentations. (*filled circles*) Specific glucose consumption rate (q_s, g glucose per g dcw) (*open squares*) specific growth rate (μ, h^{-1}) (*open circles*) specific acetate production rate (q_{Ac}, g acetate per g dcw per h) (*filled triangles*) specific lactate production rate (q_{Lac}, g lactate per g dcw per h)

Table 1 Biomass concentrations, biomass molar yields, and oxygen uptake for anaerobic and aerated fermentations by *Bifidobacterium infantis* in TPYG medium at 37°C. *ND* Not determined. Results are means of two independent experiments

Aeration rates (vvm)[a]	Biomass[b] (g l^{-1})	Biomass yield[c] (g dcw per mmol glucose)	Specific uptake rate of oxygen (mmol of O_2 per g dcw per h)
0	2.1±0.06	0.11	ND
0.02	1.84±0.09	0.11	0.02
0.04	1.92±0.08	0.12	0.11
0.06	1.85±0.08	0.11	0.34
0.08	1.81±0.09	0.13	0.10
0.1	1.59±0.09	0.11	0.04

[a]Volume of air per volume of liquid per min
[b]Biomass data were taken at 12 h of fermentation
[c]Dry cell weight (dcw) per mmol glucose consumed

Table 2 Metabolite concentration and product yields after 12 h, for anaerobic and aerated fermentations by *B. infantis* in TPYG medium at 37°C. Values in parentheses are percentages of glucose converted to the product. Data are means of two experiments. *ND* Not determined

Aeration rates (vvm)	Metabolite concentration (mM)			Product yield (mmol product per mmol glucose)			Acetate/lactate ratio
	Acetate	Lactate	Formate	Acetate	Lactate	Formate	
0	27.5±3.9 (47.8)	8.1±0.53 (21.1)	5.30±0.07 (4.6)	1.45	0.43	0.28	3.4:1
0.02	22.8±1.3 (45.9)	13.5±0.65 (40.8)	–[a]	1.37	0.82	ND	1.7:1
0.04	28.4±1.6 (58)	14.4±0.34 (44.1)	0.72±0.73 (0.73)	1.86	0.94	0.05	1.9:1
0.06	33.2±4.2 (65.4)	18.3±0.88 (54.1)	0.67±0.67 (0.65)	1.98	1.09	0.04	1.8:1
0.08	23.2±4.9 (52.6)	16.5±0.22 (56.2)	0.11±0.1 (0.12)	1.68	1.16	0.01	1.4:1
0.1	20.0±1.1 (45.3)	11.8±0.56 (40)	0.28±0.27 (0.31)	1.37	0.81	0.02	1.7:1

[a]Not detected

Discussion

The results indicate that *B. infantis* is able to grow in the presence of up to 80% DO, showing a high aerotolerance under the conditions used in this work (starting fermentations without oxygen). A gradual incorporation of oxygen into the medium contributed to obtaining good growth under oxic conditions, suggesting that a period of adaptation for the cell is needed. Although lower specific growth rates and glucose consumption rates were obtained under aerated conditions (Fig. 2), the presence of oxygen did not affect the direction of glucose to biomass, as similar biomass yields for aerated and anaerobic fermentations were obtained (Table 1).

The declines of % DO during the exponential growth phase confirmed oxygen assimilation by the microorganism. Shimamura et al. (1992), reported NADH oxidase as the major enzyme involved in oxygen consumption by *B. infantis*, since superoxide dismutase activity played only a minor role in the reduction of oxygen by this microorganism. Q_{O2} values, therefore, possibly reflect in vivo activity of NADH oxidase. After the maximum value was obtained at 0.06 vvm (Table 1), Q_{O2} values dropped, suggesting that the activities of enzymes involved in the oxygen tolerance system of *B. infantis* are regulated. Induction of NADH oxidase under oxic conditions in some *Streptococcus* spp. has been described (Matsumoto et al. 1996), as well as in other facultatively anaerobic bacteria, e.g. *Zimomonas mobilis* (Nishiyama et al. 2001). Also, Talwalkar and Kailasapathy (2003) reported that NADH oxidase and NADH peroxidase are induced in *B. infantis*, *B. lactis*, *B. pseudolongum*, and *B. longum*.

The maximum Q_{O2} value reached by *B. infantis* was 0.34 mmol O_2 g^{-1} h^{-1} (0.06 vvm). This is ten times lower than the Q_{O2} value of 3.61 mmol O_2 g^{-1} h^{-1} reported for *Lactococcus lactis* MG1363, a facultative anaerobe, when 5% DO was maintained in a continuous mode in a bioreactor (Jensen et al. 2001). Unlike bifidobacteria, some lactic acid bacteria show faster growth rates and greater biomass yields in the presence of oxygen. A shift from anoxic to oxic cultivation also produced changes in sugar metabolism, mainly from lactate to acetate, doubling the amount of ATP formed (Condon 1987). Homolactic bacteria metabolism shifts from lactate to acetate in the presence of oxygen and from ethanol to acetate in heterolactic bacteria (Sakamoto and Komagata 1996). Our results show that acetate concentrations were slightly affected by oxygen, except at 0.1 vvm; thus, the metabolic capacity of *B. infantis* seems to be affected at airflows higher than 0.06 vvm. The q_{Ac} values were lower for

aerated fermentations (Fig. 2). This result explains the lower growth rates obtained during aerated fermentations, since acetate production is coupled to ATP production. Higher q_{Lac} values (Fig. 2) were obtained with air. Carbon recovery through lactate and lactate molar yields increased significantly, from 21.1% and 0.43 mmol lactate per mmol glucose under the anoxic condition to 56.2% and 1.16 mmol $mmol^{-1}$ in the presence of air (Table 2). Pyruvate formate lyase, the enzyme involved in formate synthesis, has been reported to be strongly oxygen-sensitive (Sawers and Bock 1988); in accordance with this finding, only traces of formate were produced in the presence of air (Table 2). This shift in the final product proportion in the presence of air would be beneficial from the technological point of view, as the organoleptic characteristics of the product would improve with a higher lactate proportion and the disappearance of formate.

Meile et al. (1997) found that *B. lactis* tolerates 10% oxygen supplied in the headspace atmosphere of the reactor. In the presence of oxygen, the lactate concentration was higher than under the anoxic condition; 5.6 mM in the anaerobic culture, and 9.9 mM in the aerated one. The increment in lactate production lowered the acetate/lactate ratio from 10.1:1 to 4.7:1. Similarly, our results show that *the B. infantis* acetate/lactate ratio decreased in the presence of air as a result of incremental increases in lactate, indicating a change in carbohydrate metabolism (Table 2). In another study, conducted with four *Bifidobacterium* spp. (Talwalkar and Kailasapathy 2003), oxygen apparently decreased lactate production in contrast to our results. However, a comparison of the data from both studies is difficult since different strains, different media (with a higher glucose concentration), and different aeration conditions were used.

In conclusion, the inoculation of *B. infantis* in a CO_2 environment, followed by a gradual incorporation of oxygen with low airflow rates, resulted not only in aerotolerance of the strain, but also in enhanced lactate production. This fermentation condition can be applied to the manufacture of probiotic preparations in order to counteract the effect of oxygen on biomass production by the microorganism. The accumulation of lactate and the disappearance of formate suggests a change in pyruvate metabolism, but further studies are needed to elucidate this effect. Furthermore, the results on changes in final metabolite concentrations open the possibility to balance acetate/lactate molar ratios with aerated fermentations for organoleptic purposes.

Acknowledgments We are grateful to Carmen Fajardo from the Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa, for technical assistance.

References

Beerens H, Gavini F, Neut C (2000) Effect of exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. Anaerobe 6:65–67

Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1993) Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. Appl Environ Microbiol 59(12):4121–4128

Bezkorovainy A, Miller-Catchpole R (1989) Ecology of bifidobacteria. In: Biochemistry and physiology of bifidobacteria. CRC, Boca Raton, FL, pp 29–72

Condon S (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol Rev 46:269–280

Desjardins M, Roy D, Toupin C (1990) Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium* ssp. J Dairy Sci 73:1478–1484

De Vries W, Stouthamer AH (1969) Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. Arch Mikrobiol 65:275–287

Gismondo MR, Drago L, Lombardi A (1999) Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. Int J Antimicrob Agents 12:287–292

Jensen BNS, Melchiorsen CR, Jokumsen KV, Villadsen J (2001) Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate. Appl Environ Microbiol 67(6):2677–2682

Matsumoto J, Higuchi M, Shimada M, Yamamoto Y, Kamio Y (1996) Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the H_2O-forming NADH oxidase from *Streptococcus mutans*. Biosci Biotech Biochem 60:39–43

Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M (2002) Technological challenges for future probiotic foods. Int Dairy J 12:173–182

Meile L, Ludwig W, Rueger U, Gut C, Kaufmann P, Dasen G, Wenger S, Tueber M (1997) *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. Syst Appl Microbiol 20:57–64

Nishiyama Y, Massey V, Takeda K, Kawasaki S, Sato J, Watanabe T, Niimura Y (2001) Hydrogen peroxide-forming NADH oxidase belonging to the peroxiredoxin oxidoreductase family: existence and physiological role in bacteria. J Bacteriol 183:2431–2438

Pirt JS (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, London, pp 156–158

Sakamoto M, Komagata K (1996) Aerobic growth and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. J Ferm Bioeng 82(3):210–216

Sawers G, Bock A (1988) Anaerobic regulation of pyruvate-formate lyase from *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 170:5330–5467

Secretaría de Salud (2001) Enfermedad diarreica en niños. Boletín Práctica Médica Efectiva 3(6). Available in: http://bvs.insp.mx

Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Tomita M (1990) Endogenous oxygen uptake and polysaccharide accumulation in *Bifidobacterium*. Agric Biol Chem 54:2869–2874

Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M (1992) Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. J Dairy Sci 75:3296–3306

Talwalkar A, Kailasapathy K (2003) Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. J Dairy Sci 86:2537–2546

Talwalkar A, Kailasapathy K, Peiris P, Arumugaswamy R (2001) Application of RBGR a simple way for screening of oxygen tolerance in probiotic bacteria. Int J Food Microbiol 71:245–248

Uesugi I, Yamija M (1978) Oxygen and "strictly anaerobic" bacteria. I. Effects of dissolved oxygen on growth. Z Allg Mikrobiol 18:287–295

Wolin JM, Zhang Y, Bank S, Yerry S, Miller TL (1998) NMR detection of $^{13}CH_3{}^{13}COOH$ from 3-^{13}C-Glucose: a signature for *Bifidobacterium* fermentation in the intestinal tract. J Nutr 128:91–96

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HIST