

Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco

Departamento de Sistemas Biológicos-Laboratorio de Biotecnología No. 104

Reporte Final para realizar el Servicio Social



Título del proyecto específico: Caracterización bioquímica de *Bifidobacterium longum*

Proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos

Etapa: Diseño y desarrollo de productos biológicos por métodos biotecnológicos o de ingeniería genética

Alumno: Bruno Morales Martínez

Matricula: 2183072828

Asesor interno No.1: Lino Mayorga Reyes

No económico: 8491

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'L. Mayorga', written over a faint, wavy line.

Asesor externo No. 2: Raquel González Vázquez

No. Económico: 900030 No. de cédula: 09165459

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. González', written over a faint, circular scribble.

Introducción

El cuerpo contiene miles de especies diferentes de microorganismos que existen en una relación simbiótica con los humanos, ayudando en la digestión de los alimentos y protegiendo contra los ataques de otras bacterias. Dicho ecosistema formado por billones de microorganismos se le denomina microbiota humana, la cual puede cambiar con el tiempo y se ve afectado por factores como la higiene personal, la edad, el estilo de vida y la dieta. (Sheposh, 2017)

El consumo de probióticos confiere beneficios para la salud, como equilibrar la microbiota intestinal y mantener la homeostasis del metabolismo del huésped. *Bifidobacterium longum* es considerado un microorganismo probiótico capaz proteger eficazmente contra enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal (Tamaki et al., 2016; M. Zhang et al., 2017), síndromes metabólicos como la obesidad y la hiperlipidemia (Al-Sheraji, Amin, Azlan, Manap, & Hassan, 2015), y trastornos cerebro-intestino como el síndrome del intestino irritable y la colitis crónica (Bercik et al., 2011; Pinto Sanchez et al., 2017). Como habitante común del tracto gastrointestinal (TGI), se ha demostrado que *B. longum* posee una capacidad superior de colonización intestinal, la cual es una habilidad importante para que los probióticos proporcionen sus efectos beneficiosos in vivo. Sin embargo, los mecanismos de colonización intestinal de esta cepa son poco conocidos. Los estudios han demostrado que la colonización puede estar asociada con los recursos de carbono, sales biliares, ácidos, respuestas inmunes, competencia con otros microbios y eliminación de la mucosa en el intestino. (Zhang et al., 2019)

El presente estudio tiene como objetivo la caracterización bioquímica de *B. longum* de una cepa aislada de un infante para conocer su capacidad metabólica, exponiéndola a una variedad de sustratos (glucosa, fructuosa, sacarosa, inulina y mucina) y así relacionar la información reportada del metabolismo que expresan algunos genes con la capacidad de *B. longum* para resistir el estrés gastrointestinal. Además, de determinar si *B. longum* puede formar biopelículas como lo reportan bacterias de su mismo género, brindando dicha información como utilidad en la producción de alimentos y bebidas funcionales a futuro.

Planteamiento del problema

B. longum es considerado un microorganismo probiótico, conocido por estimular las funciones protectoras del sistema digestivo y utilizado para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales, además de ser un estimulante para el fortalecimiento del sistema inmunológico y una microbiota sana (Pavón Belinchón & Guillán Pavón, 2005). Al ser un probiótico, puede formar parte de suplementos alimenticios e incluso ser utilizado para desarrollar un alimento funcional que, al añadirse en la dieta, pueda proveer múltiples beneficios a la salud superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales. Estos efectos positivos que produce el consumo de *B. longum* pueden verse implicados tanto en el mantenimiento del estado de salud, como en la reducción del riesgo de padecer una enfermedad (Pavón Belinchón & Guillán Pavón, 2005). En consecuencia, la caracterización bioquímica de *B. longum* es necesaria para poder conocer la capacidad metabólica que tiene una cepa aislada en un infante, por lo tanto, la exposición de *B. longum* a una variedad de sustratos (glucosa, fructuosa, sacarosa, inulina y mucina) puede revelar si el metabolismo experimental, coincide con el metabolismo que expresan algunos genes previamente reportados y la capacidad de este para resistir el estrés gastrointestinal permitirían su posible uso como probiótico si este demuestra dicho potencial a futuro.

Pregunta de investigación

¿*B. longum* logrará metabolizar una serie de sustratos (glucosa, fructuosa, sacarosa, inulina, mucina), resistirá condiciones *in vitro* similares a las que hay en el TGI, y su exposición a diferentes sales biliares resultará en la formación de biopelículas como mecanismo de supervivencia de la bacteria?

Hipótesis

Si *B. longum* fue aislada del TGI de un infante y estuvo expuesto a una serie de sustratos y condiciones *in vivo*, entonces, tendrá la capacidad de metabolizar una serie diferente de sustratos y mostrar resistencia gastrointestinal *in vitro*, posiblemente a través de la formación de biopelículas.

Objetivos generales

- Caracterizar bioquímicamente a *B. longum* aislado del TGI.

Objetivos específicos

- Determinar la cinética de crecimiento de *B. longum* en sustratos mono y disacáridos (glucosa, sacarosa y lactulosa), polisacáridos (inulina) y proteínas (mucina).
- Determinar la capacidad de *B. longum* para resistir el estrés del TGI.

Antecedentes

Bifidobacterium longum

Las bifidobacterias son microorganismos anaerobios obligados en la rama de las bacterias Grampositivas con alto contenido de G-C. Existen 32 especies de bifidobacterias; las cuales se han aislado de la vagina humana y de la cavidad oral, pero la gran mayoría son del TGI. Son los primeros colonizadores del TGI de recién nacidos y predominan en lactantes alimentados con leche materna durante la lactancia. Se cree que esta colonización progresiva es importante para el desarrollo del sistema inmunitario, la falta de tal tolerancia conduce posiblemente a alergias alimentarias e inflamación crónica (Romero Arguelles, 2020).

B. longum es una bacteria Gram positiva, anaeróbica, inmóvil, no esporulada y catalasa negativa. Presentan forma cocoide, con protuberancias y/o bifurcaciones. Su nombre hace referencia a las formas bífidas con dos ramas en Y o V que presentan en ocasiones. Este género representa el 3 % del microbioma total del intestino de humanos adultos sanos y es la especie predominante en el tubo gastrointestinal de niños, estando presentes en una concentración del 95 % en recién nacidos alimentados con leche materna. Estudios recientes han demostrado que la implementación de *B. longum* reduce la duración y gravedad de la diarrea por infecciones virales, así como las reinfecciones mediante la modulación de la respuesta inmune. Aunado a esto, permite el mantenimiento un tracto digestivo sano, inhibiendo el crecimiento de bacterias dañinas, así como la estimulación activa del sistema inmunológico (Romero Arguelles, 2020).

Capacidad metabólica de *B. longum*

B. longum posee múltiples vías catabólicas, lo que le permite utilizar una gran variedad de nutrientes y aumentar su competitividad entre el microbiota intestinal. *B. longum* fermenta aminoácidos de cadena larga e hidroliza sales biliares. Estas bacterias no solamente producen ácido láctico a partir del metabolismo de los carbohidratos, sino también ácido acético, y se consideran microorganismos exigentes ya que requieren factores específicos para el crecimiento. *B. longum* puede utilizar un amplio rango de carbohidratos, entre ellos, glucosa, galactosa, fructuosa y lactosa (Medina Gutiérrez, 2002).

Por otra parte, el crecimiento de *B. longum* es estimulado por sustancias no digeribles por el hombre (prebióticos), que deben ser efectivos para escapar de la digestión del tracto intestinal superior y llegar al intestino grueso y así poder ser utilizado por bifidobacterias, entre estos prebióticos, se encuentra la inulina, un fructooligosacárido presente en cebolla, ajos y cereales, el cual está reportado que el consumo de este probiótico incrementa 10 veces el número de bifidobacterias en el intestino (Medina Gutiérrez, 2002).

En cuanto a los productos del metabolismo, las bifidobacterias producen a partir de la degradación de los carbohidratos: ácido acético y ácido láctico, además se producen pequeñas cantidades de ácido fórmico, etanol y ácido succínico. La formación de ácido láctico y acético tiende a disminuir el pH del intestino, inhibiendo así el crecimiento de levaduras y bacterias que causan la putrefacción intestinal (Medina Gutiérrez, 2002).

Resistencia de *B. longum* en condiciones acidas

La acidez es una condición ambiental comúnmente encontrada por las bacterias presentes en productos lácteos fermentados y el TGI. Durante la producción de probióticos o alimentos funcionales con bifidobacterias, la viabilidad de las bacterias se ve afectada por la acidez del medio de cultivo, los procesos de secado por aspersión en frío, durante su conservación en anaquel y por la presencia de oxígeno en el empaque. De éstos, el ambiente ácido derivado de los procesos de fermentación es el principal factor que limita la viabilidad de las bifidobacterias. Durante el tránsito en el TGI las bifidobacterias deben sobrevivir a las condiciones extremas de acidez en el estómago y a la inmediata presencia de sales biliares del duodeno para asegurar su funcionalidad. El acondicionamiento de bifidobacterias y bacterias lácticas a condiciones de estrés, al final de la fase de crecimiento exponencial o durante la fase estacionaria, permite que las bacterias presenten una mayor resistencia a

condiciones posteriores más extremas. Bajo estos tratamientos los microorganismos son capaces de responder a condiciones de estrés, sintetizando una gran variedad de proteínas particulares, las cuales promueven el plegamiento adecuado de ellas (Mayorga Reyes et al., 2009).

En un modelo experimental de simulación del TGI, *B. bifidum* mostró ser tolerante a la acidez cuando el pH disminuyó de 5.0 a 1.8 en un período de 80 min, mientras que, en otros estudios han reportaron cepas de bifidobacterias resistentes a la acidez cuando el jugo gástrico simulado fue adicionado de proteína de leche y mucina ya que estos ejercieron capacidad amortiguadora (Mayorga Reyes et al., 2009).

La búsqueda de bacterias con características de resistencia a condiciones de estrés es importante en la industria de alimentos por la posibilidad de tener mejores productos, con mayor número de bacterias probióticas viables que les permita un tránsito fácil por el TGI y llegar a su sitio de acción para colonizar y ejercer su efecto probiótico (Mayorga Reyes et al., 2009).

Probióticos y alimentos funcionales

Los principales problemas de salud pública que afectan a la población mexicana están asociados con trastornos metabólicos del sistema digestivo siendo las de mayor incidencia las infecciones entéricas, gastrointestinales, enfermedad intestinal inflamatoria, e incluso el síndrome de intestino irritable y el cáncer de colon; esto se ha asociado a estilos de vida con una alimentación inadecuada y a la pérdida de microorganismos probióticos en la microbiota del humano (Sánchez Pérez, Gutiérrez Vargas, & León Galván, 2020).

Esta situación ha demandado el desarrollo de nuevos productos que cumplan con el requerimiento nutricional y que sean de fácil y rápido acceso para el consumidor. En ese sentido surgen los alimentos funcionales. Un alimento funcional hace referencia a alimentos que promueven una salud óptima ayudando a reducir el riesgo de enfermedades, y que sólo puede considerarse funcional si logra demostrar un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo. Los alimentos funcionales descritos hasta la fecha se centran en adicionar micronutrientes, fibra dietética, metabolitos secundarios, y probióticos, siendo estos últimos dirigidos principalmente a niños y a ancianos ya que en términos generales mejoran la respuesta inmunológica (Sánchez Pérez et al., 2020).

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en la cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso a la salud del hospedero. Para ser considerado probiótico es necesario que se hayan realizado estudios que demuestren en humanos que demuestren los beneficios concretos, entre estos probióticos se encuentran bacterias del género *Bifidobacterium*, los cuales requieren prebióticos (fuente de carbono) específicos. De manera particular *B. longum* es una bacteria probiótica que se considera un excelente regulador del sistema inmune y que ayuda a restaurar la microbiota intestinal. Existen muchos productos en el mercado que contienen alguna especie de *Bifidobacterium*, sin embargo, a la fecha todos requieren refrigeración pues son derivados lácteos como yogurt, queso, entre otros. Por otra parte, existe la búsqueda para desarrollar un alimento biofuncional que no requiera refrigeración y que mantenga viable durante la vida de anaquel la bacteria probiótica *B. longum* y esta pueda llegar intacta al colon (Sánchez Pérez et al., 2020).

Metodología

Producción de un stock de *B. longum*

B. longum LBUX23 (NCBI Bioproyecto PRJNA924960) fue incubado 24 h a 37 °C en medio MRS adicionado con cisteína al 5%, posteriormente el cultivo fue centrifugado a 4 °C por 15 min a 13 000 rpm y lavado con PBS 1X pH 6.8 para ser transferido a un nuevo medio MRS adicionado con cisteína e incubado durante 24 h a 37 °C. Este procedimiento se realizó tres veces para asegurar tener una concentración de biomasa suficiente. Posteriormente el caldo de fermentación final fue centrifugado y lavado con PBS como se mencionó anteriormente, el sobrenadante fue desechado y la biomasa suspendida en 10 mL de PBS adicionado con glicerol al 5% para finalmente dosificarlo en tubos de 1.5 mL a un volumen de 100 µL, los cuales serán almacenados a 4 °C hasta su uso (González-Vázquez et al., 2015).

Previo al almacenamiento se determinará las UFC/mL de uno de los tubos como se describe a continuación.

Determinación de UFC por cuenta en placa

Se tomó una alícuota de 100 μ L del medio de cultivo para realizar diluciones seriadas del mismo, posteriormente se sembró en agar MRS adicionado con cisteína al 5% una alícuota de 5 μ L por triplicado de cada dilución. Las cajas de agar fueron incubadas a 37 °C en anaerobiosis durante 24 h para posteriormente contar el número de colonias en la dilución que contenía entre 30 y 100 UFC, los resultados se expresaron como UFC /mL (González-Vázquez et al., 2015).

Determinación de la curva de crecimiento en diferentes sustratos

El crecimiento microbiano durante la cinética fue determinado por cuenta en placa, para lo cual primero se llevó a cabo la activación de la cepa en medio anaerobio de MRS adicionado con cisteína al 5% a 37 °C por 8 h, posteriormente se tomó un mL de dicho cultivo y se suspendió con amortiguador de fosfatos para luego ser centrifugado a 12000 rpm por 3 min, finalmente se volvió a suspenderse en 1 mL del mismo amortiguador y se tomó 100 μ L para hacer 6 diluciones seriadas de las cuales se sembró 5 μ L por triplicado en agar MRS adicionado con cisteína. Las UFC/mL determinadas fueron consideradas como el tiempo inicial. A la par a este procedimiento se incubaron a 37 °C la biomasa de 10 mL del cultivo inicial previamente lavado con amortiguador de fosfatos, en 10 mL de caldo TPY. Una alícuota de 100 μ L fue tomada a la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 y 24 h para determinar las UFC/mL en agar TPY (Olvera, Gutierrez, Azaola, & Mayorga, 2013). Este procedimiento se llevó a cabo utilizando diferentes carbohidratos que se enlistan a continuación (2g/L): glucosa, sacarosa, inulina, lactulosa y mucina.

Determinación de la tolerancia del microorganismo al estrés gastrointestinal

La capacidad de los microorganismos aislados para sobrevivir a saliva simulada (SS), fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF) se determinó de acuerdo con Olvera-Romero et al. (2018) y González-Vázquez et al. (2015). La solución de SS consistió en una solución estéril de PBS (pH 6.2) y lisozima al 0.01% (p/v). El SGF consistió en PBS esterilizado ajustado con HCL (1M) (J.T. Baker, EE. UU.) a pH 1.5, utilizando un medidor de pH (Orion 410A+, Thermo Scientific, EE. UU.) y 3 g/L de pepsina. El SIF consistió en una solución estéril de PBS pH 6.8 suplementada con 0.5% (p/v) de oxgall. La tolerancia se determinó comparando el recuento de células (UFC/mL) antes y después de la exposición a cada condición de estrés. Un mililitro de un cultivo de toda la noche se lavó dos veces con

PBS (pH 7). Luego, se ajustó a 0.5 unidades de densidad óptica a 600 nm, se suspendió en 1 mL de SS y se incubó a 37 °C durante 5 min en condiciones anaeróbicas. La solución resultante se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min con una centrífuga Sol-Bat (modelo t5094, México) y luego el sedimentó, suspendió en 1 mL de SGF y se incubó a 37 °C durante 90 min en condiciones anaeróbicas con agitación suave. Posteriormente, la solución se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas para separar el sedimento, que luego se suspendió en 1 mL de SIF y se incubó a 37 °C durante 150 min con agitación suave. Todos los experimentos se realizarán por triplicado.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) y se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) (STATGRAPHICS® Centurion XVII, 2014 por Statpoint Technologies, Inc.) Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$ con la prueba de Levene.

Resultados

Determinación de la curva de crecimiento en diferentes sustratos

Se llevaron a cabo cultivos de *B. longum* durante 8 h utilizando glucosa, lactulosa, xilosa, CMC y lactosa como única fuente de carbono debido a la disponibilidad de estos. En la Figura 1 se muestran los resultados de las fermentaciones en donde se realizaron los cálculos del conteo en placa, obteniendo el mayor crecimiento en UFC/mL con la xilosa a las 6 h, superando incluso el máximo crecimiento obtenido con la glucosa. En cuanto a la lactulosa y la CMC se observa un máximo crecimiento a las 8 h, sin embargo, no se logró observar que dichos cultivos hayan entrado en fase estacionaria o de muerte, por lo que si la fermentación continuara posiblemente el crecimiento sería mayor a lo reportado a las 8 h. Además, se observa el cambio de pH de los mismos cultivos, demostrando que el pH desciende en promedio 9 % en todas las fermentaciones realizadas, siendo el cultivo con glucosa el que más descenso de pH presentó en un 15 %. El crecimiento de *B. longum* en estos sustratos probablemente se deba a que el genoma de esta bacteria presenta genes que hidrolizan una gran cantidad de azúcares (NCBI Bioproyecto PRJNA924960)

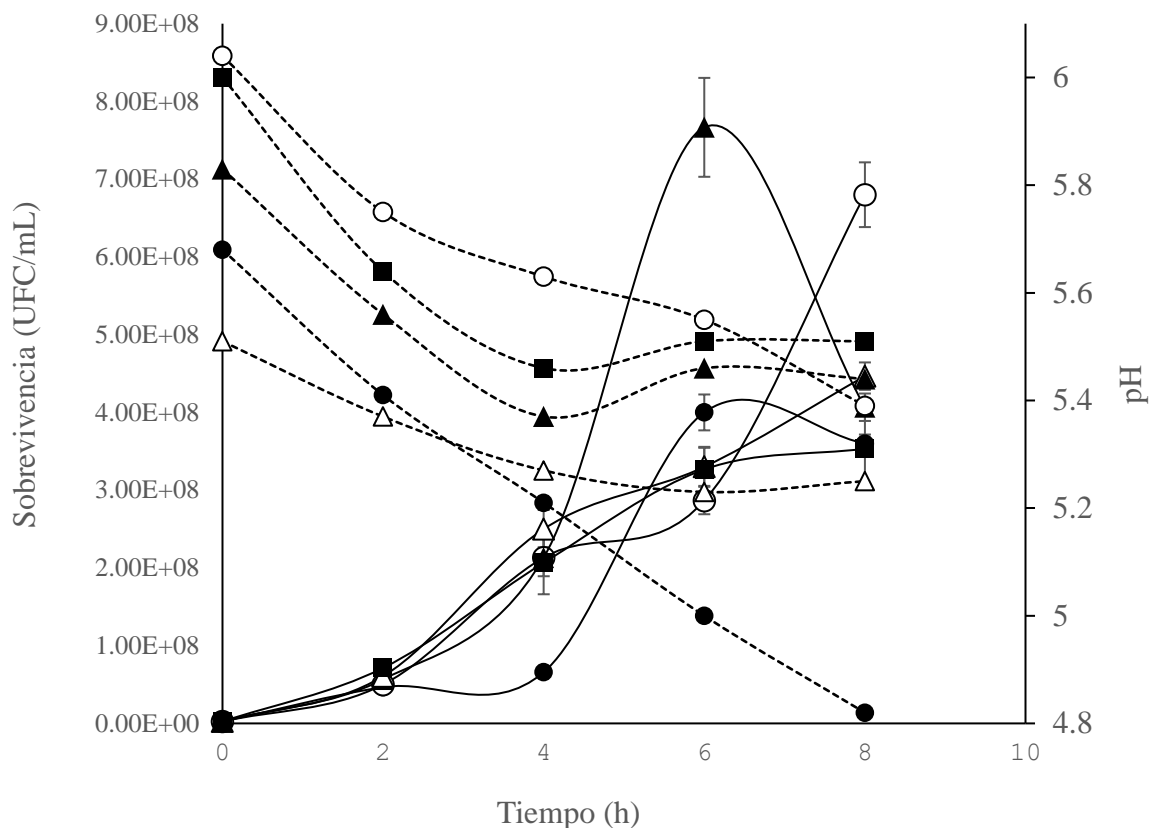


Fig 1. Efecto de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento de *B. longum*. Las líneas continuas en negro corresponden al crecimiento (UFC/mL), y las líneas negras punteadas indican cambios en el pH a lo largo del tiempo con respecto a las diferentes fuentes de carbono utilizadas, glucosa (●), lactulosa (○), xilosa (▲), CMC (△) y lactosa (■). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar.

Determinación de la tolerancia del microorganismo al estrés gastrointestinal

Para la determinación de la tolerancia a la acidez se realizaron cultivos discontinuos inoculando la cepa *B. longum* en viales previamente ajustados con diferentes pH en una escala de 4 a 7, utilizando el pH 7 como control. Después de 2 h de incubación se observaron los resultados presentados en la Figura 2, demostrando que hubo una diferencia significativa ($p > 0.05$) en el recuento viable de los cultivos a pH 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 con respecto al control en 2 órdenes de magnitud.

En cuanto a la tolerancia al estrés gastrointestinal (Figura 3) utilizando la solución de saliva simulada, fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado se observó una disminución del recuento de células viables, sin embargo, la disminución fue menor a un orden de magnitud, sin mostrar diferencias significativas entre el recuento del inóculo original con los obtenidos después de la exposición a dichas soluciones.

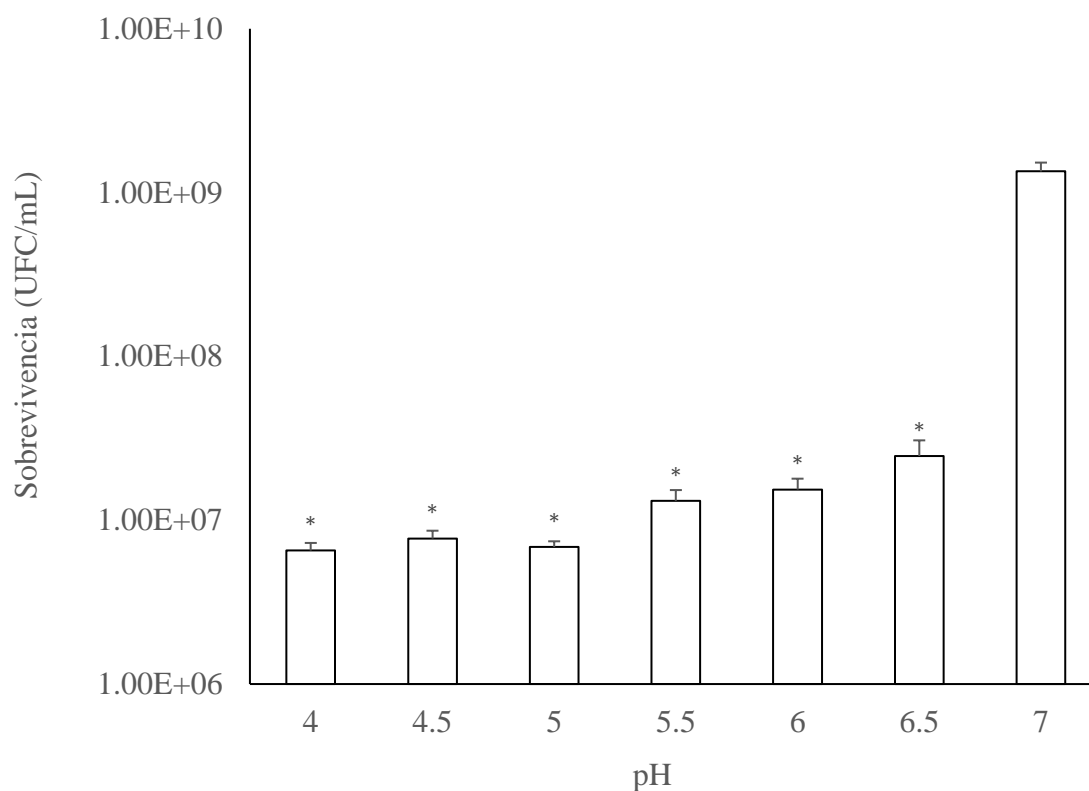


Fig 2. Recuento de células viables de los cultivos de *B. longum* expuestos a diferentes valores de pH previamente ajustados después de 2 h. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Un asterisco indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los recuentos de cada pH con el control de pH 7.

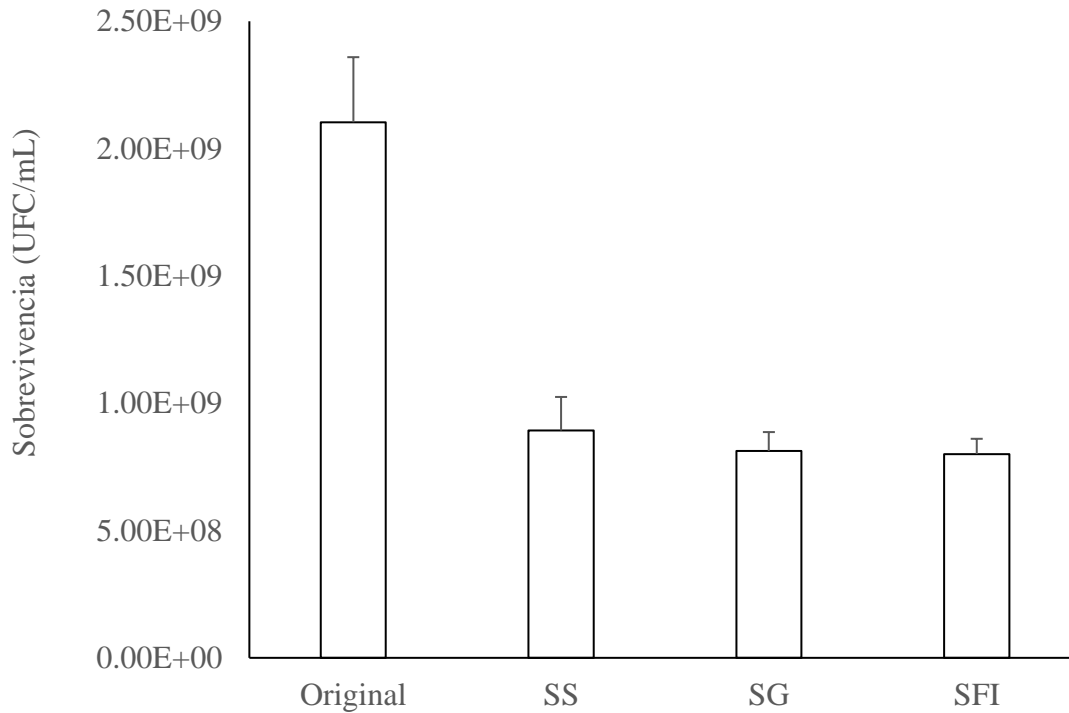


Fig 3. Recuento de células viables del cultivo de *B. longum* expuesto a una solución saliva simulada (SS), después a fluido gástrico simulado (SGF) y por último a fluido intestinal simulado (SIF). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar.

Discusión

En la actualidad, existe una comprensión incompleta del metabolismo de los carbohidratos en las bifidobacterias. La vía bífidus es una vía principal del metabolismo de los carbohidratos que ocurre en todo el género bifidobacterias. Esta vía también se conoce como derivación de fructosa-6-fosfato en el género *Bifidobacteria*, en donde las hexosas se metabolizan exclusiva y específicamente por la vía de la fructosa-6-fosfato (Palframan, Gibson, & Rastall, 2003).

Algunos de los azúcares utilizados en este experimento se tratan de carbohidratos sencillos que son metabolizados por *B. longum* según la literatura (Shah, 2011). Los monosacáridos distintos de la glucosa pueden metabolizarse por la vía bífidus, sin embargo, se sabe poco sobre la fermentación de la xilosa por las bifidobacterias. En estos organismos, la xilosa

isomerasa convierte la xilosa en xilulosa y luego la xilulosa quinasa la fosforila para formar xilulosa-5-fosfato. Entonces, la xilulosa-5-fosfato puede incorporarse a la vía bífida, aunque a un costo de ATP y un acetato en comparación con la glucosa (Bezkorovainy, 1989). En este contexto, es interesante notar que *B. longum* tuvo un mayor crecimiento en presencia de xilosa que en glucosa y otros carbohidratos utilizados. Esto podría deberse a que *B. longum* posee un mecanismo de transporte más eficiente para la xilosa que para la glucosa. Alternativamente, se sabe que las enzimas de la ruta bífida no se expresan en los mismos niveles en todas las especies de bifidobacterias (Bezkorovainy, 1989). Esto también podría explicar las diferencias en las preferencias de carbohidratos dentro del género.

La lactosa es un disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa, el cual se ha reportado que la cepa *B. longum* NCC2705 puede utilizar preferentemente sobre glucosa como fuente de carbono y energía (Parche et al., 2006), los autores sugieren que esto se logra (parcialmente) mediante la regulación a la baja de la expresión de un operón de lactosa que actúa de manera dependiente de la lactosa, cambiando así el equilibrio de absorción y metabolismo entre glucosa y lactosa. Este potencial para usar lactosa se menciona que contribuye a la adaptación al tracto gastrointestinal de los mamíferos en los primeros meses de vida, cuando la lactosa es una fuente de carbono predominante (Parche et al., 2006).

En este estudio los resultados indican que la glucosa es igual o mejor aprovechada que la lactosa por *B. longum* siendo contradictorio a lo que mencionan Parche y col., sin embargo, la utilización de la lactulosa, que es un isómero de la lactosa formado por la unión de fructosa y galactosa, supera en crecimiento los cultivos a comparación de los que utilizaron glucosa e inclusive no se logra apreciar el final de la fase exponencial a las 8 h de la fermentación de dichos cultivos, lo que sugiere que este carbohidrato está muy bien adaptado para *B. longum* LBUX23 ya que, aprovecha el disacárido de una manera más eficiente que la glucosa, posiblemente debido a que esta cepa se obtuvo de un infante. Como se mencionó anteriormente, este potencial puede ser debido a un mecanismo de represión, sin embargo, a diferencia de la cepa *B. longum* NCC2705, en el caso de la cepa *B. longum* LBUX23 la represión es provocada por la lactulosa y además podría poseer un mecanismo de transporte más eficaz para dicho carbohidrato, en especial para la fructosa.

Respecto a la CMC, no se muestra claramente si estos cultivos pudieran tener un mayor crecimiento que lo reportado a las 8 h, por lo que se necesitaría repetir el experimento contemplando más horas de fermentación para el cultivo utilizando CMC como única fuente de carbono. Aunque la CMC al ser un carbohidrato más complejo que los utilizados, se podría esperar que *B. longum* gastara mucha más energía en metabolizar dicho polisacárido, por lo que este crecimiento no llegaría a ser mayor a los reportados con carbohidratos más simples.

Además, haciendo una búsqueda en el genoma de la NCBI (Bioproyecto PRJNA924960) se encontró que dentro de la base de datos creada para *B. longum* LBUX23 se han reportado 2 genes relacionados con el metabolismo de la xilosa, entre ellos el gen *xyIA* que codifica para una xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5) responsable de convertir la xilosa en xilulosa y además la presencia del gen *xyIB* que codifica para la enzima xilulosa quinasa (EC.C 2.7.1.17) la cual fosforila la xilulosa para formar xilulosa-5-fosfato y así se pueda metabolizarla por la vía bifidus como se mencionó anteriormente. Conjuntamente, otros genes implicados en el metabolismo de la lactosa y galactosa, carbohidrato que se libera al hidrolizar la lactosa, se han reportado en la misma base de datos y se recopilan dentro de la Tabla 1. De la misma manera se encontró que dentro del genoma, la base de datos reporta varios represores de operón lactosa como se observa en la Tabla 2, lo que respalda lo mencionado anteriormente que *B. longum* está claramente adaptada a un ambiente enriquecido con lactosa, es por ello que se puede encontrar varios genes relacionados con el metabolismo de los azúcares mencionados a diferencia de otros.

Tabla 1. Genes relacionados con el metabolismo de la xilosa, lactosa y galactosa reportados en *B. longum* LBUX23 (Bioproyecto PRJNA924960)

Gen	Tipo de enzima que codifica	Identificador EC	Función enzima
<i>xylA</i>	xilosa isomerasa	5.3.1.5	Interconversiones de pentosa y glucuronato
<i>xylB</i>	xilulosa quinasa	2.7.1.17	Interconversiones de pentosa y glucuronato
<i>UGP2</i>	UDP-glucosa pirofosforilasa	2.7.7.9	Transferasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>lacS</i>	lactosa/raffinosa/galactosa permeasa	No EC	Transportador de lactosa y galactosa
<i>lacZ</i>	beta-galactosidasa	3.2.1.23	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>bgaB</i>	beta-galactosidasa	3.2.1.23	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>galK</i>	Galactoquinasa	2.7.1.6	Transferasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>galT</i>	UDPglucosa--hexosa-1-fosfatouridiltransferasa	2.7.7.12	Transferasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>lacS</i>	beta-galactosidasa	3.2.1.23	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>malZ</i>	alfa-glucosidasa	3.2.1.20	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>Bifido2_01060</i>	alfa-galactosidasa	3.2.1.22	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>malZ</i>	alfa-glucosidasa	3.2.1.20	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>IMA</i>	oligo-1,6-glucosidasa	3.2.1.10	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>Glif</i>	UDP-galactopiranos mutasa	5.4.99.9	Isomerasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>Pgm</i>	Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	Isomerasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>galT</i>	UDPglucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	2.7.7.12	Transferasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>galE</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	5.1.3.2	Isomerasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>galE</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	5.1.3.2	Isomerasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>Glk</i>	glucoquinasa	2.7.1.2	Transferasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>INV</i>	beta-fructofuranosidasa	3.2.1.26	Hidrolasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>lacY</i>	lactosa permeasa	No EC	Permeasa implicada en el metabolismo de la lactosa
<i>Glk</i>	Glucoquinasa	2.7.1.2	Transferasa implicada en el metabolismo de la galactosa
<i>galM</i>	aldosa 1-epimerasa	5.1.3.3	Isomerasa implicada en el metabolismo de la galactosa

Tabla 2. Operones reportados en la base de datos para *B. longum* LBUX23 (Bioproyecto PRJNA924960)

Genes involucrados para el operón	Cuenta	Sentido	Comienzo	Final
<i>LacI, bgaB, NR</i>	3	-	579559	582893
<i>LacI, bgaB, NR</i>	3	-	713299	716648
<i>araA, araD, FGGY, LacI</i>	4	-	734487	740014
NR, <i>scrR</i>	2	-	1050619	1051844
NR, NR, NR	3	+	1177001	1181047
NR, NR	2	-	1236845	1239010
<i>abfA, NR, NR, BPD, LacI</i>	5	+	1570046	1576203
<i>lacI, Serpin2, NR</i>	3	-	1952645	1955594

NR: genes encontrados en el genoma de *B. longum* LBUX23 de los que su funcionalidad no ha sido reportada.

En cuanto a las tolerancias probadas, la acidez es una condición ambiental que se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal humano (Mayorga Reyes et al., 2009); el pH gástrico aumenta durante la ingesta de alimentos de 1.5 a 3.0 o 5.0 (Cotter, Hill, & reviews, 2003). Los resultados reportados indican que *B. longum* al exponerse a los carbohidratos utilizados en este estudio tiende a bajar su pH en el cultivo que se fermenta, la disminución es provocada por la producción de ácido acético que se forma al metabolizar dichos carbohidratos por la vía bífidus. Adicionalmente, se corrobora que *B. longum* puede tolerar un ambiente ácido de incluso un pH de 4, estando de acuerdo con los resultados reportados por Matsumoto et al. (2004) donde encontraron una viabilidad de *B. longum* a pH 3.0. Dicha viabilidad depende del pH, la duración de la exposición al ácido y las especies y cepas utilizadas según Lankaputhra y Shah, 1995 donde realizó un estudio *in vitro* utilizando 6 cepas de *L. acidophilus* y 9 de *Bifidobacterium*, que se mantuvieron a un pH de 1,5 a 3,0 durante ≤ 3 h, demostrando que los organismos más resistentes fueron las cepas 2401, 2409 y 2415 de *L. acidophilus*; *B. longum* cepa 1941; y *B. pseudolongum* cepa 2009. Incluso en el experimento realizado con condiciones simuladas de saliva, fluido gástrico e intestinal, se demostró que, a pesar de presenciar una disminución en el conteo de células, esto no es más que un descenso de un orden de magnitud, indicando la tolerabilidad de *B. longum* al ambiente gastrointestinal.

Cabe resaltar que este microorganismo disminuye dos ciclos logarítmicos al enfrentarse a pH menores a 7, por lo que si en el futuro se desea generar productos biotecnológicos con este microorganismo se deberá asegurar que la cuenta inicial sea alrededor de 1×10^9 UFC/mL para que el descenso no afecte la viabilidad del microorganismo y pueda mantenerse como en este experimento a una cuenta de 1×10^7 UFC/mL, de igual manera se ha de tener en consideración la disminución de pH provocada por la producción del ácido acético en la metabolización de los carbohidratos a utilizar y sumado con la disminución que pueda provocar todo el recorrido expuesto a diferentes enzimas y sales que presentes en el ambiente del TGI.

El conocimiento de las rutas de fermentación de carbohidratos por las diferentes cepas existentes de bifidobacterias puede permitir la selección específica de carbohidratos dirigidos a especies particulares de microorganismos probióticos. Aunque la glucosa es una fuente de carbono atractiva para la fabricación industrial debido a su capacidad para soportar un rápido crecimiento, puede conducir a la producción de una biomasa bacteriana insuficiente cuando el cultivo posee enzimas con una mejor capacidad de metabolización para otros tipos de sustratos, como ejemplo, la xilosa para *B. longum* LBUX23.

La caracterización actual de probióticos se caracteriza por actuar a nivel de género. No obstante, se sabe que no todas las bifidobacterias tienen los mismos beneficios para la salud. Por ejemplo, Gibson y Wang (1994) demostraron que la actividad antipatógena de varias especies de bifidobacterias difería. Por lo tanto, es muy deseable caracterizar la especificidad de especie de sustratos que cada una metaboliza. Los probióticos, tal vez en combinación con los prebióticos correctos, pueden convertirse en un medio importante para prevenir y tratar enfermedades.

Sin embargo, los beneficios de la terapia probiótica aún necesitan más investigación para realizar plenamente un potencial prometedor, esta debe centrarse en las áreas de identificación de cepas que puedan soportar el paso a través del tracto gastrointestinal, la identificación de especies y cepas probióticas que sean eficaces contra procesos específicos de enfermedades o para la prevención de enfermedades, la investigación de los mecanismos de acción probiótica (Bezkorovainy, 2001). Por lo que un probiótico ideal sería aquel que

puede sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal, establecerse permanentemente en el intestino delgado y el colon, y proporcionar un beneficio específico para la salud del huésped al provocar una respuesta inmune; secreción, producción y síntesis de compuestos beneficiosos, además de utilizar como fuente de energía un prebiótico previamente seleccionado y que sea el óptimo para su sobrevivencia dentro del sistema gastrointestinal.

Conclusiones

El presente estudio permitió caracterizar bioquímicamente a *B. longum* LBUX23 aislado del TGI de un neonato, determinando la cinética de crecimiento en diferentes sustratos como glucosa, lactosa, lactulosa, xilosa y CMC confirmando que la bacteria es capaz de metabolizar dichos sustratos y aprovecharlos para mantener un crecimiento viable en un medio de cultivo como lo es el TPY. Adicionalmente, se determinó la capacidad de *B. longum* para resistir el estrés del TGI, comprobando que este microorganismo es capaz de tolerar ambientes ácidos de hasta un pH de 4 y mantener una viabilidad estable a pesar de estar expuesto a soluciones simuladas de saliva, fluido gástrico e intestinal.

Bibliografía

- Al-Sheraji, S., Amin, I., Azlan, A., Manap, M., & Hassan, F. (2015). Effects of Bifidobacterium longum BB536 on lipid profile and histopathological changes in hypercholesterolaemic rats. *Beneficial Microbes*, 6(5), 661-668. doi:<https://doi.org/10.3920/BM2014.0032>
- Bercik, P., Park, A. J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., . . . Verdu, E. F. (2011). The anxiolytic effect of Bifidobacterium longum NCC3001 involves vagal pathways for gut–brain communication. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(12), 1132-1139. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x>
- Bezkorovainy, A. (1989). Biochemistry and physiology of bifidobacteria: CRC press.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 399s-405s.
- Cotter, P. D., Hill, C. J. M., & reviews, m. b. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. 67(3), 429-453.

- Gibson GR, Wang X (1994) Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 118:121–127.
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L. A., Shah, N. P., & Rivera-Espinoza, Y. (2015). Isolation, Identification and Partial Characterization of a *Lactobacillus casei* Strain with Bile Salt Hydrolase Activity from Pulque. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(4), 242-248. doi:10.1007/s12602-015-9202-x
- Lankaputhra, W.E., & Shah, N.P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., & Benno, Y. J. I. j. o. f. m. (2004). H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. 93(1), 109-113.
- Mayorga Reyes, L., Bustamante Camilo, P., Gutiérrez Nava, A., Barranco Florido, E., & Azaola Espinosa, A. (2009). Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *Bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. *Revista mexicana de ingeniería química*, 8(3), 259-264.
- Medina Gutiérrez, I. M. (2002). *Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bifidobacterias presentes en heces de lactantes*. (Licenciatura en Biología). Universidad de los Andes, Venezuela.
- Olvera, R. N., Gutierrez, N. A., Azaola, E. A., & Mayorga, R. L. (2013). Characterisation of a *Bifidobacterium* sp. strain isolated from human faeces and its expression of the *ack* and *ldh* genes. *African Journal of Microbiology Research*, 7(50), 5713-5718.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current issues in intestinal microbiology*, 4(2), 71-75.
- Parche, S., et al. (2006). "Lactose-over-Glucose Preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: *glcP*, Encoding a Glucose Transporter, Is Subject to Lactose Repression." *Journal of Bacteriology* **188**(4): 1260-1265.
- Pavón Belinchón, P., & Guillán Pavón, B. (2005). Alimentos funcionales. Papel de los prebióticos en nutrición pediátrica. *An. pediatr.*, 24-33.
- Pinto Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., . . . Bercik, P. (2017). Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores

and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459.e448. doi:<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003>

Romero Arguelles, R. (2020). *Efecto antiviral de bifidobacterium longum y chlorella sorokiniana en un modelo de infección in vitro*. Universidad Autónoma de Nuevo León,

Shah, N. P. (2011). Bacteria, Beneficial: Bifidobacterium spp.: Morphology and Physiology. In (pp. 381-387).

Sheposh, R. (2017). Human microbiota. In: Salem Press Encyclopedia of Health.

Sánchez Pérez, T. J. S., Gutiérrez Vargas, S., & León Galván, M. F. (2020). Microencapsulado de Bifidobacterium longum para el desarrollo de un alimento funcional. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 667-671.

Tamaki, H., Nakase, H., Inoue, S., Kawanami, C., Itani, T., Ohana, M., . . . Shibatouge, M. (2016). Efficacy of probiotic treatment with Bifidobacterium longum 536 for induction of remission in active ulcerative colitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial. *Digestive Endoscopy*, 28(1), 67-74. doi:<https://doi.org/10.1111/den.12553>

Zhang, C., Yu, Z., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Colonization and probiotic function of Bifidobacterium longum. *Journal of Functional Foods*, 53, 157-165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.022>

Zhang, M., Zhou, L., Zhang, S., Yang, Y., Xu, L., Hua, Z., & Zou, X. (2017). Bifidobacterium longum affects the methylation level of forkhead box P3 promoter in 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis in rats. *Microbial Pathogenesis*, 110, 426-430. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.029>