



**Caracterización de la enzima sal biliar hidrolasa (BSH) de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3 y de *Bifidobacterium longum* LBUX23, aislados del tracto gastrointestinal de neonatos.**



**Doctor. Lino Mayorga Reyes**

**Núm. Económico: 8491**



**Doctora. Raquel González Vázquez**

**Cédula profesional: 09165459**

**Estudiante: Bautista Hernández Jessica Isabel**

### **Resumen.**

Las bifidobacterias se han investigado debido a su interacción mutualista microbio-huésped con los humanos a lo largo de su vida, son parte de las primeras bacterias que colonizan el intestino poco después del nacimiento. Este trabajo tiene como objetivo determinar el crecimiento de *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y de *B. longum* LBUX23 en diferentes sales biliares, así como su actividad enzimática de la sal biliar hidrolasa. *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y *B. longum* LBUX23 fueron capaces de tolerar concentraciones de sales tanto primarias como secundarias para su crecimiento. La actividad *B. longum* LBUX23 mostró una actividad del 20% en cada una de las diferentes sales y *B. pseudocatenulatum* JCLA3 mostró una actividad de BSH mayor del 60%, tanto en sales primarias como secundarias

**Palabras clave:** *B. pseudocatenulatum* JCLA3, *B. longum* LBUX23, sales biliares, actividad BSH

### **Introducción.**

En México y en el mundo el sobrepeso y la obesidad son graves padecimientos que afectan a los individuos causando el deterioro crónico de la salud y un gran costo de atención médica para el sistema de salud pública, ambos padecimientos en la mayoría de los casos son producto de los malos hábitos alimenticios y el estilo de vida (Abenavoli *et al.*, 2019). Con respecto a los hábitos alimenticios, actualmente hay muchos alimentos con alto contenido de carbohidratos, grasa, además de ser pobres en fibra, lo que fuertemente impacta en la diversidad del microbiota intestinal, causando una disbiosis intestinal de los miembros bacterianos y otras especies (Blaut, 2015).



El microbiota intestinal humana afecta el metabolismo del huésped y se ha implicado en la fisiopatología de la obesidad, sobrepeso y los síndromes metabólicos, enfermedades crónicas como diabetes tipo 2, hígado graso no alcohólico y enfermedades cardiovasculares (Li *et al.*, 2021; Gilbert *et al.*, 2018). El microbioma es el conjunto de bacterias que viven dentro y sobre los cuerpos humanos ya que tienen una fuerte influencia en el funcionamiento del cuerpo. Cuando comemos, el cuerpo libera compuestos llamados ácidos biliares para ayudar a digerir los alimentos (Yao *et al.*, 2018). Los ácidos biliares quienes facilitan la absorción de grasa en el intestino pero que también ejercen funciones similares a las hormonas a través de la activación de receptores unidos a la membrana, por lo tanto, modulan la glucosa, los lípidos y el metabolismo energético, la integridad intestinal y la inmunidad. Lo anterior ha permitido identificar las vías de señalización de los ácidos biliares como posibles dianas farmacológicas para las enfermedades relacionadas con la obesidad (Li *et al.*, 2021).

Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado y se secretan en el tracto gastrointestinal para absorber los nutrientes después de las comidas y para controlar el crecimiento microbiano intestinal; mientras tanto, los microorganismos intestinales metabolizan los ácidos biliares, lo que determina la composición de ácidos biliares circulantes y el tamaño de la reserva y regula el metabolismo del huésped (Chiang y Ferrell, 2019). Una vez que los ácidos biliares llegan al colon, las bacterias que residen allí usan enzimas para modificar químicamente los compuestos. Yao *et al.* identificó por primera vez una versión selectiva de una enzima bacteriana intestinal prevalente llamada de sal biliar hidrolasa (BSH) (Yao *et al.*, 2018).

La actividad BSH es un rasgo deseable en bacterias probióticas como las que pertenecen al género *Bifidobacterium*, las cuales forman una parte importante en la flora bacteriana humana que comúnmente se encuentra en el intestino. Por un lado, se considera que la hidrólisis de las sales biliares representa un mecanismo de desintoxicación de la bilis para las bacterias comensales intestinales, además que la mayoría de estas especies poseen una actividad de BSH (Ruiz *et al.*, 2021).

### **Planteamiento del problema y justificación.**

La investigación sobre los ácidos biliares ha aumentado debido a estudios recientes que demuestran su capacidad para impactar en el huésped, el microbioma y varios estados de enfermedad (Bustos *et al.*, 2018). Los miembros de la microbiota del tracto gastrointestinal inician el metabolismo de los ácidos biliares a través de un primer paso catalizado por hidrolasas de sales biliares, estas enzimas hidrolizan y desconjugan la glicina o la taurina del núcleo de esteroides de los ácidos biliares primarios, además que la actividad de las hidrolasas de sales biliares actúa como un guardián de las transformaciones posteriores de los ácidos biliares, así, la BSH son una herramienta prometedora para la manipulación específica de la microbiota. Así la amplia distribución y abundancia de esta enzima en el tracto gastrointestinal sugiere que la desconjugación de ácidos biliares es un rasgo adaptativo seleccionado de varias especies bacterianas para la patogénesis dentro del huésped, por lo



que ha habido un gran interés en estudiar la actividad de la BSH de cepas de *Bifidobacterium* porque estas especies están asociadas con la desconjugación en el intestino delgado y se cree que albergar estas enzimas las cual son una característica beneficiosa de los probióticos (Foley *et al.*, 2019). Para una adecuada actividad, esta enzima debe ser liberada en el intestino delgado donde ocurre la digestión de los lípidos. Sin embargo, el sitio exacto de liberación utilizando bacterias vivas es menos predecible que otros sistemas (Hernández-Gómez *et al.*, 2021). De tal forma que las investigaciones en torno a esta enzima están enfocadas en la búsqueda de nuevas cepas con potencial probiótico con una capacidad de producir SBH, así los probióticos que contengan BSH puedan probablemente ejercer un efecto de la disminución de colesterol sérico.

## Objetivos.

### Objetivo general

Determinar el crecimiento de *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y de *B. longum* LBUX23 en diferentes sales biliares, así como su actividad enzimática de la sal biliar hidrolasa.

### Objetivos particulares.

- Determinar la cinética de crecimiento de *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y de *B. longum* LBUX23 en presencia de sales biliares primarias, secundarias y una mezcla de ellas.
- Evaluar la actividad de la enzima sal biliar hidrolasa de *B. pseudocatenulatum* JCLA3y de *B. longum* LBUX23 en presencia de sales biliares primarias, secundarias y una mezcla de sales.

### Hipótesis.

- Si *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y *B. longum* LBUX23 crecen en diferentes sales biliares, entonces estas bacterias serán capaces de expresar la BSH

### Marco teórico.

#### *Los ácidos biliares y su clasificación.*

Los ácidos biliares son metabolitos del colesterol producidos exclusivamente en el hígado a través de un proceso complejo de varios pasos (Li *et al.*, 2021). Además, los ácidos biliares son una parte importante del proceso de solubilización y digestión de los lípidos de la dieta y, del mismo modo, la concentración de ácidos biliares en el duodeno determina en cierta medida la eficiencia de la absorción de lípidos a través del tracto gastrointestinal (Xu *et al.*, 2018).



Los ácidos biliares son importantes detergentes fisiológicos para emulsionar grasas dietéticas, fármacos y vitaminas liposolubles en el intestino, de las cuales después se absorben y transportan al hígado para su metabolismo y distribución a otros tejidos y órganos (John y Chiang, 2017). Como anteriormente se mencionó los ácidos biliares se sintetizan a partir del colesterol en los hepatocitos, donde después se conjugan con los aminoácidos glicina o taurina para formar sales biliares y transferirse al intestino.

Los ácidos biliares se clasifican en sales biliares primarias (cólico y quenodesoxicólico) que al igual que las secundarias (deoxicólico y litocólico) están conjugadas con aminoácidos como la glicina y la taurina (glicocólico, glicokenodesoxicólico, taurocólico y tauroquenodesoxicólico; glicodeoxicólico, glicolitocólico, taurodeoxicólico y taurolitocólico). La conversión de las sales biliares primarias en secundarias por el microbiota intestinal involucra tres grupos principales de enzimas bacterianas, entre ellas las SBHs, que son sintetizadas por una gran cantidad de genes y han sido identificados en más de 100 géneros bacterianos. Las SBHs catalizan la desconjugación de las sales biliares primarias por hidrólisis de las fracciones de glicina o taurina de la posición C24 en la cadena lateral de sales biliares. Recientes estudios han clasificado estos genes en familias de 7 u 8 subgrupos que parece variar en la especificidad del sustrato y son asociados con diferentes enfermedades (Li *et al.*, 2021).

Muchos microorganismos probióticos tienen la capacidad de producir la SBHs como un mecanismo para tolerar el efecto antimicrobiano de las sales biliares conjugadas. Las sales biliares desconjugadas se vuelven insoluble y son excretadas en las heces activando una síntesis *de novo* de sales biliares a expensas de colesterol, lo que puede contribuir a disminuir la concentración de colesterol en suero de personas con hipercolesterolemia (Hernández-Gómez *et al.*, 2021). Para una adecuada actividad, esta enzima debe ser liberada en el intestino delgado donde ocurre la digestión de los lípidos. Sin embargo, el sitio exacto de liberación utilizando bacterias vivas es menos predecible que otros sistemas, como la SBHs microencapsulada, sin embargo, el costo de usar enzimas purificadas microencapsuladas es elevado incluso en el caso de extractos crudos, una posible solución involucra encontrar nuevas cepas silvestres capaces de producir altas cantidades de enzima o diseñar microorganismos en los que el gen de algunas de estas hidrolasas sean clonados y expresen una sobreproducción de dicha enzima (Hernández-Gómez *et al.*, 2021).

### ***Síntesis de los ácidos biliares en el hígado.***

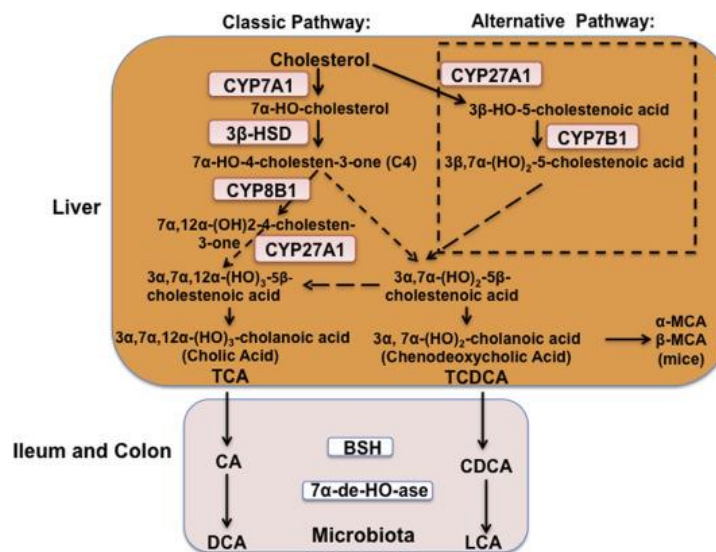
Los ácidos biliares sintetizados en el hígado son ácidos biliares primarios: el ácido cólico y el quenodesoxicólico, los cuales se sintetizan a partir del colesterol a través de dos vías:

- Vía clásica: Es iniciado por la enzima limitante de la velocidad colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1). Para la síntesis de ácido cólico (ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxicolan-24-oico), se requiere esterol 12 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP8B1) para la 12 $\alpha$ -



hidroxilación de  $7\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona, el cual es un intermediario y marcador para la tasa de síntesis de ácidos biliares. El esteroide mitocondrial 27-hidroxilasa (CYP27A1) cataliza la oxidación de las cadenas laterales de esteroides, seguida de la escisión oxidativa de una cadena lateral de 3 carbonos para formar ácidos biliares ácido cólico y quenodesoxicólico (Bustos *et al.*, 2018) (Figura 1).

- Vía alternativa: Esta vía es iniciada por el CYP27A1 para la síntesis de ácidos biliares mediante la hidroxilación y oxidación del colesterol a ácido  $3\beta$ -hidroxi-5-colestenoico, que luego es  $7\alpha$ -hidroxilado por la oxisterol  $7\alpha$ -hidroxilasa (CYP7B1) para formar ácido  $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi-5-colestenoico (Bustos *et al.*, 2018) (Figura 1).



**Figura 1. Vías de síntesis de ácidos biliares.** Dos vías de síntesis de ácidos biliares están involucradas en la conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado. La vía clásica la inicia el colesterol  $7\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) y la vía alternativa la inicia el esteroide 27-hidroxilasa (CYP27A1), (John y Chiang,2017).

En los seres humanos, la vía clásica de síntesis de ácidos biliares es la vía predominante alrededor de un 82 %, para la síntesis de un grupo de ácidos biliares altamente hidrofílicos que consta de aproximadamente un 30 % de cada uno de ácido cólico y el quenodesoxicólico y ácido desoxicólico. La contribución relativa de las vías de síntesis de ácidos biliares clásica y alternativa a la síntesis de ácidos biliares determina el tamaño y la composición de la reserva de ácidos biliares (John y Chiang,2017).

### **BSH.**

La BSH también denominada hidrolasa de coloiliglicina, el cual está presente en el microbiota intestinal puede catalizar la hidrólisis de las sales biliares (Song *et al.*, 2019), Además la BSH participa en una variedad de procesos metabólicos en los mamíferos, incluida la regulación de la absorción de lípidos en la dieta, el metabolismo del colesterol, la energía, así como la



homeostasis de la inflamación, por otro lado, la actividad de BSH puede afectar el metabolismo de los lípidos del huésped, la recolección de energía y el aumento de peso corporal, por lo que es una estrategia prometedora para controlar la obesidad en humanos (Xu *et al.*, 2019).

Las BSHs ya se ha identificado en varios géneros microbianos, incluidos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides*. Los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se utilizan usualmente como cepas probióticas, mientras que los *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterococcus* son habituales en el tracto gastrointestinal (Song *et al.*, 2019).

## Material y métodos

- Crecimiento de *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y *B. longum* LBUX23

*B. pseudocatenulatum* JCLA3 y *B. longum* LBUX23 se harán crecer en medio MRS adicionado con sacarosa (5g/L) y cisteína (5%). Después de la inoculación los medios de cultivo serán incubados en una atmósfera anaerobia que contendrá 85 % de nitrógeno, 10 % de CO<sub>2</sub> y 5 % de hidrogeno. Transcurridas 8 h de crecimiento se tomará 1 mL y se centrifugará a 12000 rpm para retirar el caldo de cultivo y el sobrenadante será lavado con solución amortiguadora de fosfatos pH 7. El inóculo será ajustado a 0.5 unidades de densidad óptica a 600 nm, para posteriormente determinar las unidades formadoras de colonia por medio de cuenta en placa y además inocular el volumen correspondiente a las 0.5 unidades de densidad óptica en medio MRS adicionado con sacarosa (5g/L), cisteína (5%) 0.5% p/v de sales primarias glicocolato, ácido taurocólico y sales secundarias como ácido glicodeoxicólico, y ácido taurodeoxicólico, así como una mezcla de sales como oxgal. Una vez inoculado cada medio, será incubado a 37 °C por 8 h. El crecimiento del microorganismo será determinado a las 0, 2, 4 ,6 y 8 h por el método de cuenta en placa. Todas las determinaciones se harán por triplicado (González-Vázquez *et al.*, 2014).

- Determinación de la actividad enzimática de BSH

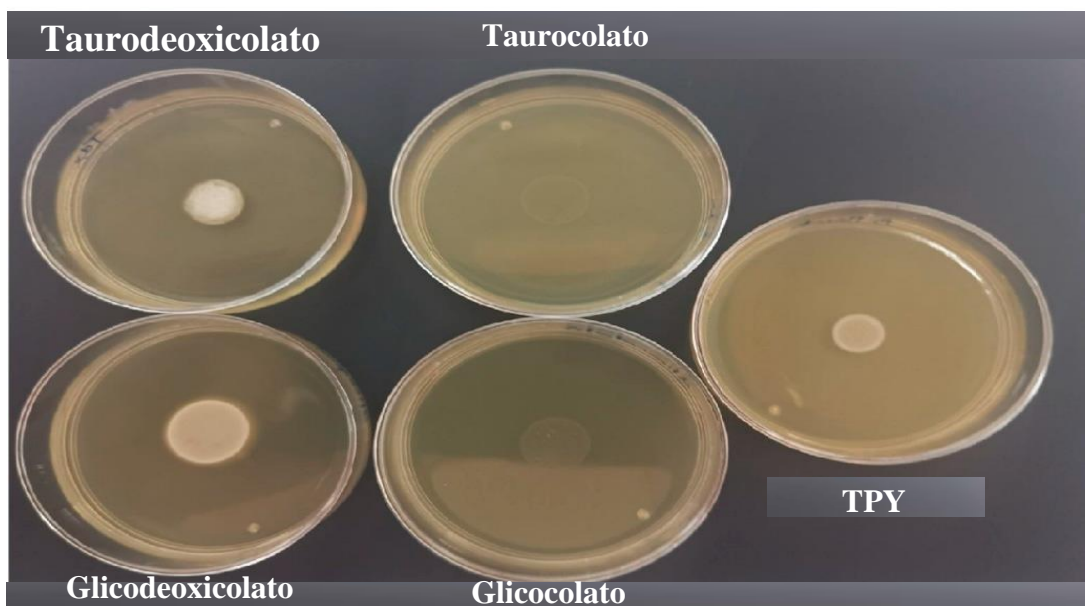
Se tomará una muestra de 1 mL del caldo de cada matraz utilizado en el crecimiento de cada uno de los microorganismos, y será centrifugado por 5 min a 12000 rpm y 50 µL del sobrenadante será mezclado con 50 µL de buffer de fosfatos 0.1M pH 7 y 100 µL de una solución de la sal biliar correspondiente al 0.5% p/v. Con el fin de proteger a la enzima contra la oxidación, 10 µL de ditioneitol (DTT) 10 mM serán adicionados y se incubará a 37 °C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación se agregarán 100 µL de ácido tricloroacético para detener la actividad enzimática. Posteriormente, la mezcla se centrifugará durante 5 min a 12 000 rpm, a 4 °C y 50 µL del sobrenadante se mezclarán con 50 µL de agua destilada y 1.9 mL de reactivo de ninhidrina [0.5 mL de ninhidrina al 1 % p/v en tampón de citrato 0.5 M (pH 5.5), 1.2 mL de glicerol, 0.2 mL de solución tampón citrato 0.5 M, pH5.5]. La mezcla se hervirá durante 14 min y se enfriará durante 3 min utilizando un baño

de hielo. La absorbancia se determinará a 570 nm. Previamente, se elaborará una curva estándar utilizando glicina o taurina y 10  $\mu$ L DTT 10 mM. La unidad de actividad de BSH se definirá como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 mmol de aminoácidos por 1 mL de sustrato por minuto y expresado por unidad de gramo de proteína. La concentración de proteína será determinada por micro ensayo de Bradford utilizando el kit Bio-Rad Protein (Bio-Rad, EE. UU., CA) y albúmina de suero bovino como estándar (González Vázquez *et al.*, 2014).

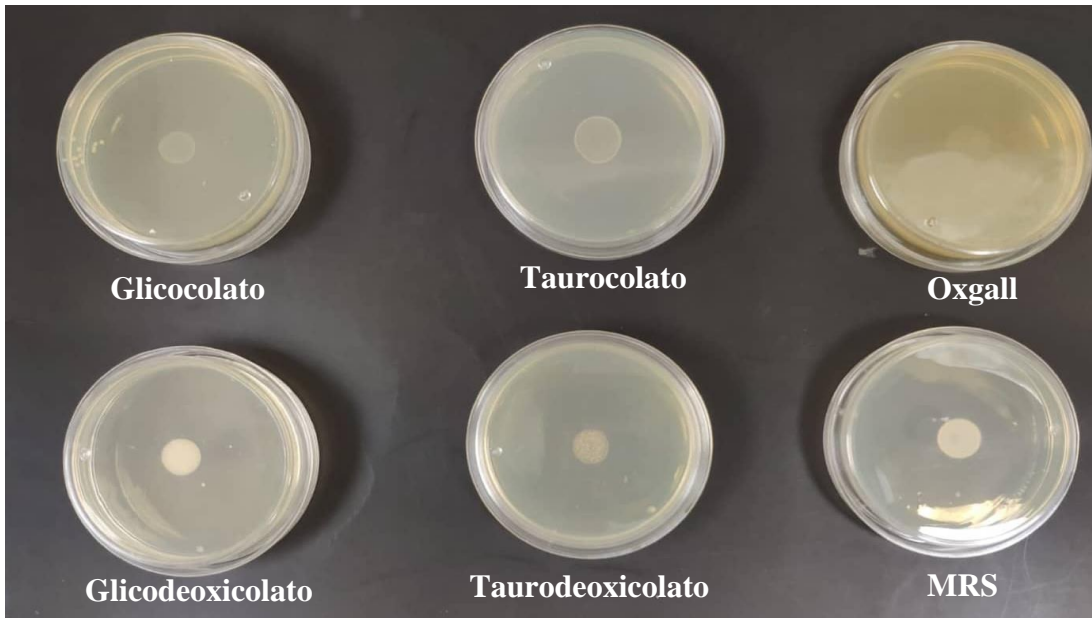
## Resultados

### Crecimiento de *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y *B. longum* LBUX23.

*B. pseudocatenulatum* JCLA3 (figura 2) y *B. longum* LBUX23 (figura 3) fueron capaces de tolerar concentraciones de sales tanto primarias como secundarias para su crecimiento, utilizando el medio TPY como control para *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y medio MRS como control para *B. longum* LBUX23.



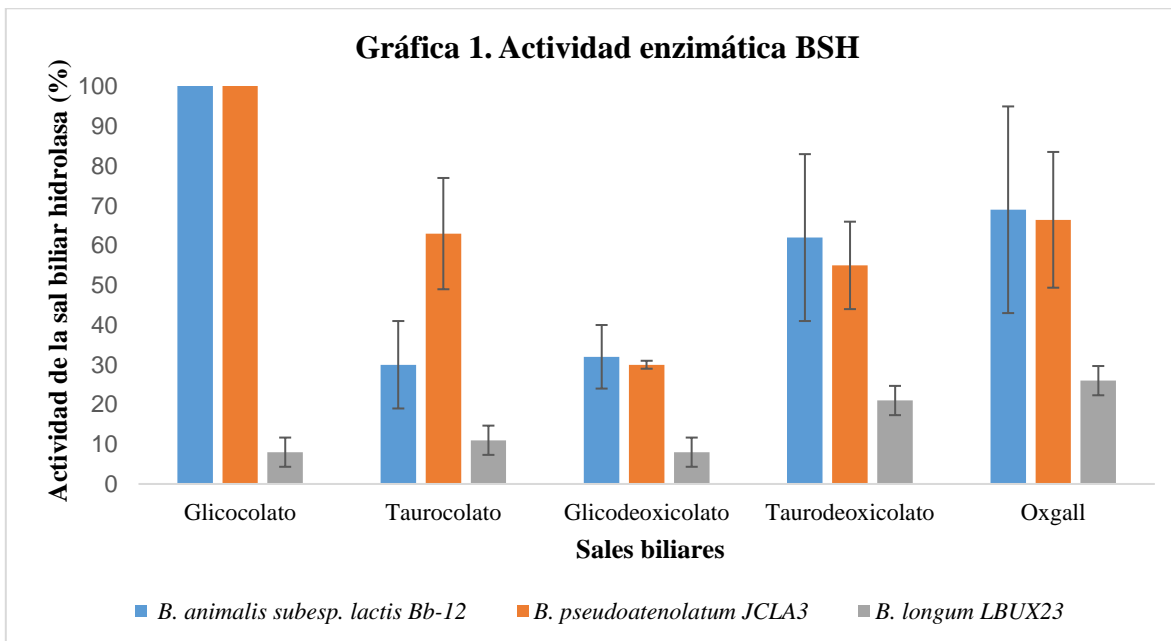
**Figura 2. Tolerancia a las sales biliares.** Crecimiento de *B. pseudocatenulatum* JCLA3 en medio TPY con sales biliares primarias y secundarias al 0.5 %.



**Figura 3. Tolerancia a las sales biliares.** Crecimiento de *B. longum* LBUX23 en medio MRS con sales biliares primarias y secundarias al 0.5 %.

### Actividad de la BSH

En este estudio se determinó la actividad enzimática BSH de los 3 microorganismos *B. animalis subesp. lactis* Bb-12, *B. pseudocatenulatum* JCLA3 y *B. longum* LBUX23 como se muestra en la gráfica 1







Como se observa en la gráfica 1, la cepa *B. animalis* subes p. *lactis* Bb-12 tiene una mayor actividad en la sal glicocolato en un 99%, oxgall (69%), taurodeoxicolato (62%) y glicodeoxicolato (30%), en cambio cuando creció en taurocolato fue menor su actividad menos del 30%. Por otro lado, la cepa *B. pseudocatenulatum* JCLA3 mostro una mayor actividad de BSH en la sal glicolato en un 99%, oxgall (66.45%), taurocolato (63%), taurodeoxicolato (55%) y presenta una menor actividad en la sal biliar glicodeoxicolato (30%). *B. longum* LBUX23 mostró una menor actividad de la BSH menos del 20% en cada una de las diferentes sales.

### **Discusión.**

El género *Bifidobacterium* está presente en los primeros años de vida y desempeña un papel importante en el desarrollo de los recién nacidos y los lactantes, lo que determinará su salud en etapas posteriores de su vida. La alteración en el número y composición de la población de *Bifidobacterium* presente en el microbioma humano se ha asociado a varias enfermedades como el síndrome del intestino irritable, obesidad y alergia, entre otras. Actualmente se ha detectado actividad BSH en bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* el cual se utilizan habitualmente como cepas probióticas (Begley *et al.*, 2006).

Las sales biliares se sintetizan principalmente a partir del colesterol mediante la conjugación con los aminoácidos glicina o taurina en el hígado y se almacenan en la vesícula biliar hasta su liberación en el duodeno en respuesta a la ingesta de alimentos grasos. Debido a su alta concentración, algunas bacterias sintetizan la enzima BSH donde su actividad puede disminuir la toxicidad de los ácidos biliares conjugados, por tanto, pueden ser menos tóxicos para las bacterias del intestino (Kumar *et al.*, 2006).

La identificación de la actividad BSH se ha incluido como criterio para la selección de cepas probiótica, en la actualidad, existe un interés creciente por el estudio de la biotransformación bacteriana de la bilis en el intestino humano, ya que se ha implicado en el desarrollo o la protección de trastornos metabólicos e inflamatorios (Ruiz *et al.*, 2021) Como se muestran en los resultados *B. longum* tiene una mayor actividad de BSH en Oxgall (26%), pero mostro diferencias significativas en la actividad en las sales glicocolato y glicodeoxicolato las cuales tuvieron una actividad menor (8%). Los resultados sugieren que la actividad de BSH es extracelular; como los resultados mostrados por Morinaga *et al.* (2022) y Kociubinski *et al.*, (1999).

Jarocki *et al.*, (2014) y Tanaka *et al.*, (1999) sugirieron de forma independiente que la actividad BSH está fuertemente correlacionada con su hábitat natural, ya que las cepas con actividad BSH proceden de un ambiente intestinal en el que están expuestas a sales biliares. Además, Bordoni y colaboradores (2013), observaron que las cepas pertenecientes a las especies *B. animalis*, *B. breve*, *B. longum* y *B. pseudocatenulatum* mostraban mayores de actividad en BSH.



Por lo tanto, en caso de utilizar al género *Bifidobacterium* específicamente *B. longum* LBUX23y *B. pseudocatenulatum* JCLA3 como suplemento debe administrarse después de consumir alimentos para aumentar previamente pH gástrico (Gunzburg *et al.* 2020) Es importante destacar que la capacidad de los probióticos para tolerar las sales biliares se ha incluido a menudo entre los criterios de selección de cepas probióticas (Begley *et al.*, 2006).

## Conclusión

*B. longum* LBUX23 y *B. pseudocatenulatum* JCLA3 toleraron diferentes concentraciones sales biliares primarias y secundarias, adicionado en medio MRS y TPY. Se ha demostrado que la actividad de la BSH en los probióticos puede ayudar a mejorar la tolerancia a las sales biliares y promover la salud intestinal, además desempeñan un papel crucial en la absorción de grasas y vitaminas liposolubles en el intestino delgado. La identificación de la actividad BSH se ha convertido en un criterio importante para la selección de cepas probióticas, ya que se ha demostrado que las cepas con una alta actividad BSH pueden mejorar la tolerancia a las sales biliares y promover la salud intestinal.

## Referencias.

- Abenavoli, L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, Aiello V, Romano B, De Lorenzo A, Izzo A A, Capasso R. (2019). Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients*, 11(11), 2690. <https://doi.org/10.3390/nu11112690>
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied Environmental Microbiology*, 72(3), 1729–1738. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006>
- Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C.G.M. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 72, 1729-1738, doi:doi:10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006.
- Blaut M. (2015). Gut microbiota and energy balance: Role in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74(3), 227-234. doi:10.1017/S00296651140017004
- Bordoni, A.; Amaretti, A.; Leonardi, A.; Boschetti, E.; Danesi, F.; Matteuzzi, D.; Roncaglia, L.; Raimondi, S.; Rossi, M. (2013). Cholesterol-lowering probiotics: in vitro selection and in vivo testing of bifidobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97, 8273-8281, doi:10.1007/s00253-013-5088-2.
- Bustos, Font V.G., Fadda S, Taranto M.P. (2018) New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Research International*. ;112:250–62.



- Chian; y Ferrell, J. M. (2019). Bile acids as metabolic regulators and nutrient sensors. *Annual Review of Nutrition*, 39, 175–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018-124344>
- Foley, O’Flaherty S., Barrangou R., Theriot C.M. (2019). Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathogens* 15(3): e1007581. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007581>
- Gilbert, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Natural Medical*. 24(4):392–400. doi:<https://doi.org/10.1038/nm.4517>.
- González-Vázquez R, Gutiérrez-López G.F, Arellano-Cárdenas S, López-Villegas E. O, Téllez-Medina D. I, and Rivera-Espinoza Y. (2014). Morphometric parameters, zeta potential and growth rate of *Lactobacillus casei* Shirota by effect of different bile salts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 189-199.
- González-Vázquez R, Gutiérrez-López G.F, Arellano-Cárdenas S, López-Villegas E. O, Téllez-Medina D. I, and Rivera-Espinoza Y. (2014). Morphometric parameters, zeta potential and growth rate of *Lactobacillus casei* Shirota by effect of different bile salts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 189-199.
- Grattepanche, Lacroix, C. (2013) Production of viable probiotic cells. In *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. pp. 321- 352.
- Gunzburg, Aung, M.M.; Toa, P.; Ng, S.; Read, E.; Tan, W.J.; Brandtner, E.M.; Dangerfield, J.; Salmons, B. (2020). Efficient protection of microorganisms for delivery to the intestinal tract by cellulose sulphate encapsulation. *Microbial Cell Factories*, 19, 216, doi:10.1186/s12934-020-01465-3.
- Hernández-Gómez JG, López-Bonilla A, Trejo-Tapia G, Ávila-Reyes SV, Jiménez-Aparicio AR, Hernández-Sánchez H. (2021). In vitro bile salt hydrolase (BSH) activity screening of different probiotic microorganisms. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(3), 674. <https://doi.org/10.3390/foods10030674>
- Jarocki, Podleśny, M.; Glibowski, P.; Targoński, Z. A. (2014). New Insight into the physiological role of bile salt hydrolase among intestinal bacteria from the genus *Bifidobacterium*. *PLOS ONE*, 9, e114379, doi:10.1371/journal.pone.0114379.
- John y Chiang. (2017). Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Research*, 1, 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2017.05.001>
- Kociubinski, Pérez, P.; De Antoni, G. (1999) Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*. 62, 905-912, doi:10.4315/0362-028x-62.8.905.



- Kumar, Brannigan, J.A.; Prabhune, A.A.; Pundle, A.V.; Dodson, G.G.; Dodson, E.J.; Suresh, C.G. (2006). Structural and functional analysis of a conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* reveals an evolutionary relationship with penicillin V acylase. *Journal of Biological Chemistry* 281, 32516-32525, doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M604172200>.
- Li, Andreu-Sanchez S, Kuipers F, Fu J (2021). Gut microbiome and bile acids in obesity-related diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 10,101493. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101493>
- Morinaga, Kusada, H.; Tamaki, H. (2022) Bile salt hydrolases with extended substrate specificity confer a high level of resistance to bile toxicity on atopobiaceae bacteria. *International Journal Molecule Science*, doi:10.3390/ijms231810980.
- Ruiz, Sánchez, B., Margolles, A. (2021). Determination of bile salt hydrolase activity in bifidobacteria.. *Methods in Molecular Biology*, 2278. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1274-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1274-3_13)
- Ruiz, Sánchez, B.; Margolles, A.(2021) Determination of bile salt hydrolase activity in bifidobacteria. *Methods and Protocols*, van Sinderen, D., Ventura, M., Eds.; Springer US: New York, NY ; pp. 149-155
- Song, Cai, Y., Lao, X., Wang X., Lin X., Cui Y., Kalavagunta P.K., Liao J., Jin L., Shang J & Li J. (2019). Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome* 7 (9). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0628-3>.
- Tanaka,; Doesburg, K.; Iwasaki, T.; Mierau, I. (1991).Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal Dairy Science* 82, 2530-2535, doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75506-2.
- Xu, Fayezy K.Ghishan. (2018). Chapter 10: Molecular physiology of gastrointestinal function during development. Physiology of the gastrointestinal tract (Sixth Edition), 235-269, *Academic Press*.
- Xu, Hu, X.J., Singh, W., Geng W., Tikhonova I. G. & Lin J. (2019). The complex structure of bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius* reveals the structural basis of substrate specificity. *Scientific Reports* 9 (12438) <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48850-6>
- Yao, Seaton, S. C., Ndousse-Fetter, S., Adhikari, A. A., DiBenedetto, N., Mina, A. I., Banks, A. S., Bry, L., & Devlin, A. S. (2018). A selective gut bacterial bile salt hydrolase alters host metabolism. *eLife*, 7, e37182. <https://doi.org/10.7554/eLife.37182>



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco



- Zhou, Pan, Y.J.; Wang, Y.B.; Li, W.F. (2007). In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8, 686-692, doi:10.1631/jzus.2007.B0686.



**Anexos.**

1. Cronograma de actividades.

Actividad	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Stock de <i>B.longum</i> LBUX23y de <i>B. pseudocatenulatum</i> JCLA3	X					
Cinética de crecimiento de <i>B. pseudocatenulatum</i> JCLA3y de <i>B. longum</i> LBUX23 en presencia de diferentes sales biliares.		X	X	X		
Determinación de la actividad de la sal biliar hidrolasa de <i>B. Pseudocatenulatum</i> JCLA3y de <i>B. longum</i> LBUX23			X	X	X	
Análisis de resultados					X	X
Elaboración de informe final					X	X

Doctor. Lino Mayorga Reyes

Núm. Económico: 8491

Doctora. Raquel González Vázquez

Cédula profesional: 09165459