



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías

“Análisis del crecimiento de *Bifidobacterium infantis* en función de la fuente de carbono y amplificación de sus genes *ldh*, *ackA* y *ppk* por la técnica de PCR”

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico en Alimentos.

PRESENTA:

Dulce Yanai Borbolla Espinosa

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. M^a Angélica Gutiérrez Nava

Pachuca, Hgo. diciembre de 2007.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Química en Alimentos **DULCE YANAI BORBOLLA ESPINOSA**, quien presenta el trabajo de titulación "**ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE *Bifidobacterium infantis* EN FUNCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO Y AMPLIFICACIÓN DE SUS GENES *ldh* Y *ackA* POR LA TÉCNICA DE PCR**" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

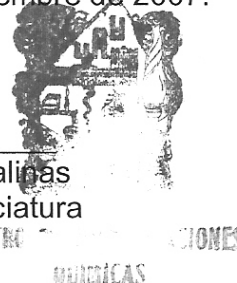
A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente	M. en C. Álvaro Cerón Beltrán
Primer vocal	Dra. Ma. Angélica Gutiérrez Nava
Segundo vocal	Dra. Judith Jaimez Ordáz
Tercer vocal	Dr. Joseantonio Godoy Reyes
Secretario	Dra. Eva María Santos López
Primer suplente	M. en C. Irais Sánchez Ortega
Segundo suplente	Q. A. Israel Oswaldo Ocampo Salinas

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
"Amor, Orden y Progreso" DE HIDALGO
Mineral de la Reforma Hidalgo, 11 de Diciembre de 2007.

Q.A. Israel Oswaldo Ocampo Salinas
Coordinador Adjunto de la Licenciatura
en Química en Alimentos



El presente trabajo se realizó en el CIQ - UAEM
bajo la dirección de:

Dra. Ma. Angélica Gutiérrez Nava.
Laboratorio de Alimentos 2

Este trabajo fue patrocinado por PROMEP
bajo el proyecto No. UAEHGO-PTC-329

DEDICADO A:

Doña Rukis y Alfred

Poyo y Nanet

Crispin y Superman

Angélica, mi guía en la gran aventura de la
Investigación y mucho más.

AGRADECIMIENTOS:

Dra. Ma. Angélica Gutiérrez Nava.

Dr. Joseantonio Godoy Reyes.

Dra. Judith Jaimez Ordáz.

Dra. Eva María Santos López.

M. C. Irais Sánchez Ortega.

Lic. Oswaldo Ocampo Salinas

Q.F.B. Álvaro Censón Beltrán

DR. Lino Mayorga Reyes (UAM-X)

Por sus acertados comentarios en la revisión de este trabajo.

A mis amigos del CIQ:

Azulita, Magoy y Germen de Soya.

CONTENIDO

1. Introducción.....	11
2. Antecedentes.....	13
2.1 Probióticos.....	13
2.2 Género <i>Bifidobacterium</i>	16
2.3 Clasificación de bifidobacterias.....	17
2.4 Crecimiento de bifidobacterias.....	19
2.5 Bifidobacterias en el ser humano.....	20
2.6 Metabolismo de bifidobacterias.....	24
2.7 Prebióticos.....	28
2.7.1 Fructo-oligosacáridos y fructanos tipo inulina.....	31
2.7.2 Galacto-oligosacáridos.....	32
2.7.3 Xilo-oligosacáridos.....	32
2.7.4 Isomalto-oligosacáridos.....	33
2.8 Efectos benéficos.....	34
2.8.1 Mejoramiento del tránsito gastrointestinal.....	35
2.8.2 Reducción en el riesgo de contraer cáncer.....	35
2.8.3 Reducción de la intolerancia a la lactosa.....	36
2.8.4 Actividad antimicrobiana.....	37
2.8.5 Prevención de enfermedades diarreicas.....	38
2.8.6 Estimulación el sistema inmune.....	38
2.8.7 Reducción de inflamación intestinal.....	39
2.8.8 Reducción del colesterol.....	39
2.8.9 Salud urogenital.....	40
2.9 Estudios moleculares en bifidobacterias.....	41
3. Justificación.....	43
4. Objetivos.....	44
4.1 Objetivo general.....	44
4.2 Objetivos específicos.....	44
5. Estrategia general.....	45

6. Materiales y Métodos.....	46
6.1 Microorganismo y condiciones de cultivo.....	46
6.2 Composición del medio de cultivo	46
6.3 Cinéticas de fermentación.....	47
6.3.1 Crecimiento.....	47
6.3.2 Cuantificación de proteína.....	47
6.3.3 Consumo de azúcares totales	48
6.4 Extracción de RNA.....	49
6.4.1 Extracción y purificación de RNA.....	49
6.5 Amplificación de genes	50
6.5.1 Diseño de primers.....	50
6.5.2 Extracción y purificación de DNA	50
6.5.3 Preparación de geles de agarosa	51
6.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
6.5.5 Purificación de productos de PCR.....	52
7. Resultados y discusión.....	53
7.1 Cinéticas de crecimiento.....	53
7.2 Cinéticas de consumo de azúcares.....	56
7.3 Cinéticas de producción de proteínas	58
7.4 Extracción de RNA.....	63
7.5 Extracción de DNA.....	64
7.6 Diseño de primers.....	65
7.6.1 Lactato deshidrogenasa (<i>ldh</i>).....	66
7.6.2 Acetato kinasa (<i>ackA</i>).....	67
7.6.3 Fosfoacetolasa (<i>ppk</i>).....	68
7.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	69
8. Conclusiones.....	75
9. Perspectivas	76
10. Referencias.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Micrografía electrónica de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> .	10
2	Microflora presente en los diferentes niveles del tracto gastrointestinal.	16
3	Metabolismo de carbohidratos por bacterias ácido lácticas y bifidobacterias.	19
4	Condiciones de reacción para amplificar por pcr los genes <i>ldh</i> , <i>ackA</i> y <i>ppk</i> de <i>B. infantis</i> .	46
5	Cinéticas de crecimiento de <i>B. infantis</i> ATCC 17930 en medio TPY utilizando a) glucosa, b) lactosa, c) inulina y d) sacarosa como fuentes de carbono al 0.5%.	48
6	Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de <i>B. infantis</i> ATCC 17930 en medio TPY- glucosa al 0.5%.	53
7	Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de <i>B. infantis</i> ATCC 17930 en medio TPY- lactosa al 0.5%.	54
8	Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de <i>B. infantis</i> ATCC 17930 en medio TPY- inulina al 0.5%.	55
9	Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de <i>B. infantis</i> ATCC 17930 en medio TPY- sacarosa al 0.5%.	56
10	Extracción y purificación de RNA total de <i>B. infantis</i> en las fases lag, log y estacionaria de cada cinética de fermentación al utilizar glucosa, lactosa, inulina y sacarosa como sustratos.	57
11	Extracción y purificación de dna de <i>B. infantis</i> a partir de un cultivo en glucosa al 0.5%. carriles M- marcador de 1kb 1-DNA de <i>B. infantis</i> .	58
12	Secuencia nucleotídica del gen <i>ldh</i> de <i>B. longum</i> donde se muestran enmarcados los nucleótidos utilizados como primers para amplificar por pcr la región codificante de 962 pb.	60

13	Secuencia nucleotídica del gen <i>ackA</i> de <i>B. longum</i> muestran enmarcados los nucleótidos utilizados como primers para amplificar por pcr la región codificante de 1230 pb.	61
14	Secuencia nucleotídica del gen <i>ppk</i> de <i>B. longum</i> donde muestran enmarcados los nucleótidos utilizados como primers para amplificar por pcr la región codificante de 2478 pb.	62
15	Gel de agarosa al 1%. Amplificación de los genes <i>ldh</i> , <i>ackA</i> y <i>ppk</i> utilizando una tm de 38°C. carriles: M-marcador 1 kb, 1- <i>ldh</i> , 2- <i>ackA</i> , 3- <i>ppk</i> .	64
16	Proceso de purificación de los fragmentos de PCR.	65
17	Gel de agarosa al 1%. genes <i>ldh</i> y <i>ackA</i> purificados. carriles: M-marcador 1 kb, 1-gen <i>ldh</i> , 3- gen <i>ackA</i> , 4- gen <i>ackA</i> .	66

ÍNDICE DE TABLAS

1	Hábitats de algunas especies del género <i>Bifidobacterium</i> .	12
2	Selección de prebióticos añadidos o presentes en la dieta.	23
3	Oligosacáridos prebióticos.	24
4	Primers utilizados para amplificar los genes <i>ldh</i> , <i>ackA</i> y <i>ppk</i> .	63

1. INTRODUCCIÓN

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. El concepto de alimentos funcionales, surge de la relación existente entre alimentación y salud así como de la posibilidad de contar con reguladores biológicos que disminuyan el riesgo de contraer enfermedades, donde las bacterias ácido lácticas juegan un papel protagónico.

Los microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas, son llamados probióticos y pertenecen principalmente a los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Tannock, 1999; Sanders, 1999). Muchos de ellos son destruidos al pasar por el estómago, mientras que otros como *Bifidobacterium*, *L. plantarum* o *L. acidophilus*, pasan a través del intestino llegando hasta el colon en altas concentraciones. Muchos trabajos de investigación han demostrado que si la flora normal del intestino es suplementada con un buen número de bacterias, la salud del individuo se ve mejorada. Sin embargo existen factores extrínsecos que afectan la viabilidad y sobrevivencia de estos microorganismos como el pH (condiciones de acidez derivadas del proceso de fermentación), el oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), las interacciones antagónicas entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración final de azúcares, el número de bacterias presentes, la temperatura, entre otros.

El impacto positivo que tienen las bifidobacterias sobre la salud del hombre es bastante aceptado, sin embargo, los mecanismos moleculares por medio de los cuales estas bacterias funcionan como probióticos, están lejos de ser entendidos. Por lo tanto, es de suma importancia, conocer el comportamiento de estas bacterias frente a diferentes

sustratos y condiciones de cultivo de manera individual y no en un ambiente natural tan complejo como lo es el colon donde existe una mezcla de fuentes de carbono, diferentes condiciones de pH, interacciones con otros microorganismos, entre otros factores. Posteriormente, y una vez conocido el comportamiento de las bifidobacterias en estos medios de cultivo simples, es importante realizar una caracterización genética con el fin de explorar, explotar y poder realizar inferencias de lo que pudiese ocurrir en la flora intestinal, para conocer los mecanismos de acción y las reacciones metabólicas involucradas en el proceso, identificando las enzimas clave que contribuyen a la obtención de sus efectos benéficos, y *a posteriori*, elaborar productos prebióticos y nutracéuticos con mejor rendimiento y efectos benéficos en el consumidor al potenciar sus actividades benéficas al formar parte de la flora intestinal del hombre.

En el presente trabajo se estudió la influencia de la fuente de carbono: glucosa, lactosa, inulina y sacarosa sobre el crecimiento de *Bifidobacterium infantis*, se amplificaron por la técnica de PCR, los genes que codifican para las enzimas lactato deshidrogenasa y acetato kinasa que son enzimas clave en la producción de ácido láctico y ácido acético. Por otra parte, se extrajo y purificó el RNA total de cada cultivo en las diferentes fases del crecimiento en los cuatro sustratos. Este trabajo servirá como base para el estudio de la expresión de genes en diferentes condiciones de cultivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 PROBIÓTICOS

El uso de microorganismos vivos para la elaboración de alimentos, tiene una larga historia. El consumo de productos elaborados con leches fermentadas data de hace miles de años. Una de las primeras menciones se encuentra en la Biblia y en los libros sagrados del hinduismo, donde describen que el kéfir (leche búlgara) se originó hace cientos de años en las montañas del Cáucaso en Rusia. El koumiss (bebida alcohólica preparada a partir de leche fermentada), data del siglo VII a.C. Ambos productos siguen siendo parte de la dieta de las poblaciones siberianas. Los productos lácteos fermentados fueron utilizados como productos terapéuticos incluso antes de que se conociera la existencia de microorganismos aunque su uso en la elaboración de alimentos, es uno de los más antiguos métodos para su producción y conservación (Leahy y col., 2005).

El término probiótico, es de origen griego y significa “*en pro de la vida*”. Este concepto nació a partir de las observaciones del ruso Eli Metchnikoff, (ganador del premio Nobel en 1907 por sus trabajos en el Instituto Pasteur), quien sugirió que es posible modificar la flora de nuestro organismo con el fin de reemplazar microorganismos patógenos con microorganismos benéficos (Metchnikoff, 1907). Lilly y Stillwell (1965) dieron el nombre de probiótico a los factores promotores del crecimiento producidos por microorganismos. Parker (1974) utilizó este término para organismos y sustancias con efectos benéficos en animales a través de la microflora intestinal. Sin embargo, no fue hasta 1989, cuando la palabra probiótico fue popularizada por Fuller (1989) quien describió a los probióticos como: “*aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el balance microbiano de su flora intestinal*”.

Recientemente, la OMS junto con la FAO, propusieron una definición que es mundialmente aceptada para el término probiótico se define como “*microorganismos vivos que son administrados en cantidades adecuadas que confieren beneficios a la salud del huésped*”.

Para que un microorganismo sea considerado probiótico, debe reunir una serie de condiciones: (Collins y Gibson, 1999)

- ✓ Ser de origen humano.
- ✓ Ejercer un efecto benéfico en el huésped.
- ✓ No ser patógeno ni tóxico.
- ✓ Contener un gran número de células viables.
- ✓ Ser capaz de sobrevivir al paso por el intestino y metabolizar dentro de él.
- ✓ Permanecer viable durante el almacenaje y uso.
- ✓ Otorgar buenas propiedades sensoriales.
- ✓ Debe tener la capacidad de adherirse a las mucosas y prevenir la adhesión de otros microorganismos patógenos.

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Penna, 1998). Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino (Pardio y col., 1994). Es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino.

El efecto protector de estos microorganismos se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica. Este antagonismo está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión. Mediante la inmuno-modulación protegen al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos (Penna, 1998).

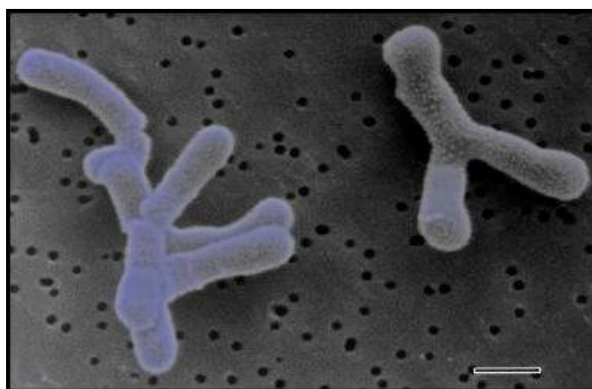
A partir de 1986, además de la microflora tradicional del yogurt: *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, se ha adicionado una tercera bacteria del género *Bifidobacterium*, algunas veces asociada con *Lactobacillus acidophilus*. Esta nueva bacteria que presentó características organolépticas bastante aceptables, ha llamado la atención de consumidores, industriales, investigadores y médicos (Ballonge, 1998) y a partir de la década de los 80, gracias a sus propiedades terapéuticas, los japoneses las incluyeron en sus dietas (Mitsuoka, 1982; Ebissawa y col., 1987).

Los investigadores se han enfocado al estudio del género *Bifidobacterium* como probióticos ya que estas bacterias, se han aislado de la flora intestinal del ser humano a diferencia de las bacterias que tradicionalmente se han empleado para la elaboración del yogurt como *Lactobacillus* y *Streptomyces* (Salminen S. y von Wright A., 1998).

2.2 GÉNERO *Bifidobacterium*

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano, fueron descubiertas por el Dr. Henry Tissier en 1899, al ser aisladas de heces fecales de niños alimentados con leche materna, y las llamó *Bacillus bifidus communis* (Tissier, 1900).

Los miembros del género *Bifidobacterium* son bastones pleomórficos Gram-positivos, cuya pared celular está formada por una capa gruesa de peptidoglucano que contiene polisacáridos, proteínas y ácidos teicoicos (Gomes y Malcata, 1999). Son bacterias no móviles y no formadoras de esporas. Presentan una morfología ramificada o bifurcada, tomando formas de Y y V por lo cual fueron llamadas Bifidus (Fig. 1). La naturaleza ramificada de las bifidobacterias no solamente depende de la cepa, sino del medio utilizado para su cultivo. Son bacterias anaerobias estrictas, aunque algunas cepas pueden ser tolerantes al oxígeno en presencia de CO₂ (Scardovi y Orla-Jensen, 1986). La sensibilidad al oxígeno, puede diferir entre especies e incluso entre cepas de la misma especie (Shimamura y col., 1992; Ahn y col., 2001).



**Figura 1. Micrografía electrónica de *Bifidobacterium adolescentis*.
(Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre).**

2.3 CLASIFICACIÓN DE BIFIDOBACTERIAS

Como ya se mencionó, cuando estas bacterias fueron descubiertas, fueron llamadas *Bacillus bifidus communis* (Tissier, 1900), sin embargo Orla-Jensen, un microbiólogo danés propuso constituir un nuevo género y llamarlas *Bifidobacterium bifidus*, formando un enlace entre las bacterias ácido lácticas y las bacterias ácido propiónicas (Orla-Jensen 1924). Sin embargo, esto no fue un consenso y durante el siglo XX estuvieron clasificadas dentro del género *Lactobacillus* por su morfología y su característica de fermentativas obligadas. Gracias a la acumulación de estudios detallados con hibridaciones de DNA, el contenido de G+C y sus capacidades metabólicas únicas, el género *Bifidobacterium* fue rescatado y hoy en día, las bifidobacterias forman un género filogenéticamente bien definido: Reino *Bacteria*, Filo *Actinobacteria*, Clase *Actinobacteria*, Subclase *Actinobacteridae*, Orden *Bifidobacteriales*, Familia *Bifidobacteriaceae*, Género *Bifidobacterium*. (Klein y col., 1998; Schell y col., 2002; Ventura y col., 2004).

Actualmente, el género *Bifidobacterium* contiene más de 30 especies, las cuales han sido aisladas principalmente del tracto gastrointestinal de varios animales y aunque se localizan con mayor frecuencia en el tracto gastrointestinal del hombre, algunas especies como *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium* o *B. longum*, pueden colonizar la vagina. Estas bacterias se encuentran también en algunos animales como bovinos, porcinos, aves, conejos, e inclusive en el intestino de abejas (Biavati y col., 2000). *B. dentium* se ha aislado de la cavidad bucal del ser humano y está asociada con caries y abscesos dentales. *B. thermacidophilum* subs. *thermacidophilum*, se ha aislado de aguas sucias (Tabla 1).

Tabla 1 Hábitats de algunas especies del género *Bifidobacterium*.

<i>Especies</i>	<i>Fuente</i>
<i>B. adolescentis</i>	Heces niños y adultos, apéndice, caries dental y vagina
<i>B. angulatum</i>	Heces adultos
<i>B. animalis</i>	Ratas, pollos, conejos y heces de becerro
<i>B. asteroides</i>	Abejas
<i>B. bifidum</i>	Heces de niños y adultos y vagina
<i>B. boum</i>	Rumiantes y heces de lechón.
<i>B. breve</i>	Heces de niños y vagina
<i>B. catenulatum</i>	Heces de niños y adultos y vagina
<i>B. choerinum</i>	Heces de lechón
<i>B. coryneforme</i>	Abejas
<i>B. cuniculi</i>	Heces de conejos
<i>B. denticolens</i>	Caries dental humana
<i>B. dentium</i>	Caries dental humana, cavidad oral y heces de adultos
<i>B. gallicum</i>	Heces de adultos
<i>B. gallinarium</i>	Heces de pollos
<i>B. infantis</i>	Heces de niños y vagina
<i>B. inopinatum</i>	Caries dental humana
<i>B. lactis</i>	Leches fermentadas
<i>B. longum</i>	Heces de niños y adultos y vagina
<i>B. mágnum</i>	Heces de conejos
<i>B. merycicum</i>	Rumiantes
<i>B. minimum</i>	Aguas residuales
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces en niños
<i>B. pseudolongum ssp</i>	Lechones, ratas, pollos, rumiantes y heces de becerros
<i>pseudolongum ssp. Globosum</i>	Lechones, becerros, ratas, conejos, y heces de cordero
<i>B. psychraerophilum</i>	Cerdos caecum
<i>B. pullorum</i>	Heces de pollos
<i>B. ruminantium</i>	Rumiantes
<i>B. saeculare</i>	Heces de conejos
<i>B. scardovii</i>	Heces de adultos
<i>B. subtile</i>	Aguas residuales
<i>B. suis</i>	Heces de lechones
<i>B. thermacidophilum</i>	Digestor anaerobio
<i>B. thermophilum</i>	Lechones, pollos, heces de rumiantes y becerro
<i>B. thermacidophilum ssp.</i>	Porcinos y heces de lechón

(Biavati y col., 2000)

2.4 CRECIMIENTO DE BIFIDOBACTERIAS

Prácticamente todas las especies de bifidobacterias utilizan una gran variedad de fuentes de carbono como lactosa, sacarosa, glucosa, galactosa y fructosa; otros compuestos como, arabinosa, xilosa, manosa, manitol y sorbitol son fermentados por un número limitado de estas bacterias (Degnan y Macfarlane, 1991). Es importante resaltar que ciertos carbohidratos como oligo-fructosa, inulina y rafinosa son promotores específicos del crecimiento de casi todas las especies de bifidobacterias por lo que han sido considerados compuestos bifidogénicos (Gibson y col. 1995).

Los principales ingredientes de los primeros medios de cultivo que se formularon para bifidobacterias, fueron tripticasa, peptona-proteosa, phytona y peptonas de carne (Reuter, 1963). Experimentos realizados con bifidobacterias provenientes de heces fecales humanas, del rumen de bovinos e intestinos de abejas, demostraron que para asegurar el mantenimiento y la sobrevivencia de estos microorganismos, es necesario, que la tripticasa y fitona estén presentes. Algunos medios para el cultivo en anaerobiosis contienen agentes reductores como L-cisteína, tioglicolato, ácido ascórbico y catalasa, con el fin de prevenir la formación de intermediarios de la reducción de oxígeno por la autooxidación del medio (Carlsson y col., 1978).

Actualmente los medios de cultivo más utilizados y adaptados para bifidobacterias son los medios **TGY** (tripticasa, glucosa, extracto de levadura), **TPY** (tripticasa, fitona, extracto de levadura) y **TPYG** (tripticasa fitona, extracto de levadura, glucosa). En cualquiera de estos medios, las colonias obtenidas después de la incubación a 37°C, en anaerobiosis, son lisas, convexas, de contorno regular, color blanco o crema y con un diámetro de 1 a 2 mm.

La mayoría de las bifidobacterias de origen humano crecen a una temperatura óptima entre 36 y 38°C mientras que las que provienen de animales, tienen una temperatura

óptima de crecimiento mayor, entre 41 y 43°C con excepción de *B. thermacidophilum* que presenta su máximo crecimiento a 49°C (Dong y col., 2000) y *B. psychraerophilum* que crece a temperaturas tan bajas como 4°C (Simpson y col., 2004). Las bifidobacterias son microorganismos ácido-tolerantes y su pH óptimo de crecimiento está entre 6 y 7 aunque *B. lactis* y *B. animalis* pueden sobrevivir a pH de 3.5 (Matsumoto y col., 2004).

2.5 BIFIDOBACTERIAS EN EL SER HUMANO

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto intestinal humano, apareciendo pocos días después del nacimiento, son microorganismos predominantes en el intestino de los bebés alimentados con leche materna, observando que éstos, tienen menores riesgos de padecer enfermedades diarreicas que los que se alimentan con fórmulas (Leahy y col., 2005).

El tracto gastrointestinal, también llamado tubo digestivo, comienza en la boca y se extiende hasta el ano. La longitud en el hombre es de 10 a 12 metros, siendo seis o siete veces la longitud total del cuerpo. Las bacterias que habitan este tracto se encuentran adaptadas a las condiciones que prevalecen en cada segmento y por lo tanto, las poblaciones de bacterias son específicas en cada lugar.

La flora intestinal se deriva de la alimentación y todas las bacterias que la forman, trabajan en armonía para el mantenimiento de la salud. Cuando nacemos, el tracto gastrointestinal es estéril e inmediatamente después comienza a ser colonizado por un número importante de bacterias principalmente *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* hasta que el lactante comienza a ingerir alimentos sólidos. Posteriormente, *E. coli* se convierte en la bacteria predominante en el íleon distal, y la flora colónica primaria es constituida

por especies del género *Bacteroides* spp. y *E. coli* principalmente (Mahan y Escott, 2000).

La flora intestinal del adulto, pesa más de un kilo y está compuesta por más de 400 especies de microorganismos diferentes como: *Bacteroiaceae*, *Peptococcaceae*, *Streptococci*, *Lactobacilli*, *Clostridium perfringens*, *Magasphaera*, *Eubacteria*, *Bididobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Vellonella*, *Clostridia*, *Fusobacteria*, entre otros (Farmworth, 2001).

La comida y la saliva que ingerimos no son estériles e incluso, algunos de los alimentos contienen microorganismos vivos. Cada día, miles de bacterias de una gran variedad de familias, entran al tracto digestivo, más del 99 % de los microorganismos que se ingieren, son destruidos en el estómago debido a los bajos niveles de pH (entre 2.5 y 3.0). Por esta razón, en individuos sanos, tanto en el estómago como en el duodeno, se encuentran bajas concentraciones de bacterias que van de 10^1 a 10^4 células/g. Las bacterias que sobreviven y pasan al intestino proliferan, aunque su desarrollo es posteriormente frenado por las sales biliares y las enzimas proteolíticas del páncreas.

El tubo digestivo continúa por el intestino grueso, donde las especies microbianas dominantes se localizan en el colon alcanzando concentraciones de hasta 10^{12} células/g de contenido intestinal. Por el contrario, la población bacteriana es mayor (10^4 a 10^8 células/g) en las regiones más alejadas del intestino delgado (Fig. 2) (Ouweland y Vesterlund, 2003).

En el tracto gastrointestinal, también existen bacterias de la flora de tránsito o de paso, que no se implantan en el intestino y que se encuentran en menores concentraciones (10^4 - 10^6 células/g), estos son gérmenes potencialmente patógenos cuya toxicidad se inhibe con la presencia de la flora dominante.

La microflora intestinal es una parte integral del sistema digestivo de todos los animales, las bacterias gastrointestinales obtienen la mayor parte de la energía para su

reproducción y crecimiento a partir de los componentes de la dieta que son resistentes al ataque de los fluidos digestivos, o bien absorbidos tan lentamente que las bacterias pueden competir con éxito por ellos. Además, si la alimentación es rica en carbohidratos complejos no susceptibles a la degradación por las amilasas salivales y pancreáticas, la población microbiana que se desarrolla es la que sea capaz de digerir estos carbohidratos. Las especies bacterianas difieren en relación a sus preferencias de sustratos y a sus necesidades para el crecimiento. Por ello, la composición química y la estructura de la ingesta, determina ampliamente la distribución de la comunidad microbiana en el tracto intestinal (Savory 1992; Wagner y Thomas, 1987).

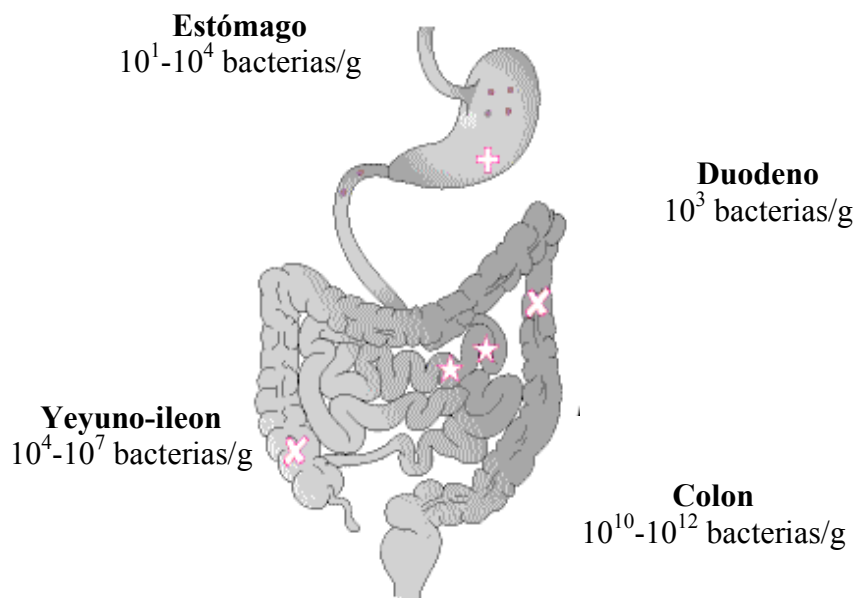


Figura 2. Microflora presente en los diferentes niveles del tracto gastrointestinal.

El tipo de microorganismos presentes en el intestino, evoluciona en función del sitio y de la alimentación ya que en cuanto mas alejado esté de la boca, la concentración de oxígeno es menor y el ambiente se vuelve anaerobio. Así mismo, se ha observado que las especies que colonizan cada parte del tracto gastrointestinal, varían en función del animal y de la composición de su dieta. Por ejemplo, los herbívoros tienen una flora que contiene altos niveles de bacterias celulolíticas, mientras que la flora del humano tiene un alto contenido de bacterias amilolíticas.

La capacidad del sistema digestivo para digerir y absorber nutrientes es, en parte, dependiente de la distribución de especies y de la población total de microorganismos residentes. Por ello, los cambios en la composición de la dieta o en la densidad de nutrientes pueden tener efectos muy importantes sobre la población microbiana intestinal lo que a su vez influye en la capacidad de los organismos para digerir y absorber nutrientes (Gibson y col., 1996; Hillman, 1999; Reid y Hillman, 1999).

Un requisito indispensable para la sobrevivencia de las bifidobacterias en el colon, es que estas bacterias tengan disponible una fuente de carbohidratos que no haya sido metabolizada en el sistema digestivo humano antes de llegar a esta región del colon (Reyed, 2007).

Puesto que las bifidobacterias son organismos sacarolíticos, su presencia en el tracto gastrointestinal de adultos y niños es de suma importancia, ya que juegan un papel muy importante en la fermentación de carbohidratos en la región del colon donde la inulina, oligofructosa y rafinosa se han reportado como compuestos promotores del desarrollo de estos microorganismos, y gracias a su proceso fermentativo se produce el mantenimiento y el desarrollo de la flora bacteriana, así como de las células epiteliales (Trindade, 2003).

Recientemente, el uso de medios de cultivo más complejos, ha permitido ver un cambio en el ecosistema del tracto gastrointestinal con importantes consecuencias en la salud del ser humano (Falony y col., 2006).

2.6 METABOLISMO DE BIFIDOBACTERIAS

Como resultado de la fermentación de carbohidratos no digeribles por la microflora del colon, se produce hidrógeno, dióxido de carbono, gas metano y ácidos grasos de cadena corta como: acético, propiónico y butírico en una proporción molar casi constante 60:25:20 (Titgemeyer y col., 1991). Sin embargo, es fundamentalmente responsabilidad de bifidobacterias y lactobacilos, la producción de estos compuestos así como de ácido láctico. Estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse (Cagigas y Blanco, 2002).

A diferencia de las bacterias ácido lácticas, las bifidobacterias producen ácido acético y ácido láctico como principales productos de fermentación en una relación molar teórica 3:2 (Stiles y Holzapfel, 1997). Esta fermentación, la llevan a cabo mediante una particular ruta metabólica conocida como “ruta bifidogénica” (Fig. 3), donde la enzima clave es la *fructosa-6-fosfato-fosfoacetolasa* (**F6PPK**) (De Vuyst, 2000).

Algunos reportes han demostrado que ciertas bifidobacterias son capaces de producir lactato, acetato, formato, etanol e incluso, cantidades muy pequeñas de succinato aunque nunca se ha reportado la formación de butirato (Ballongue, 1998; Van der Meulen y col., 2006).

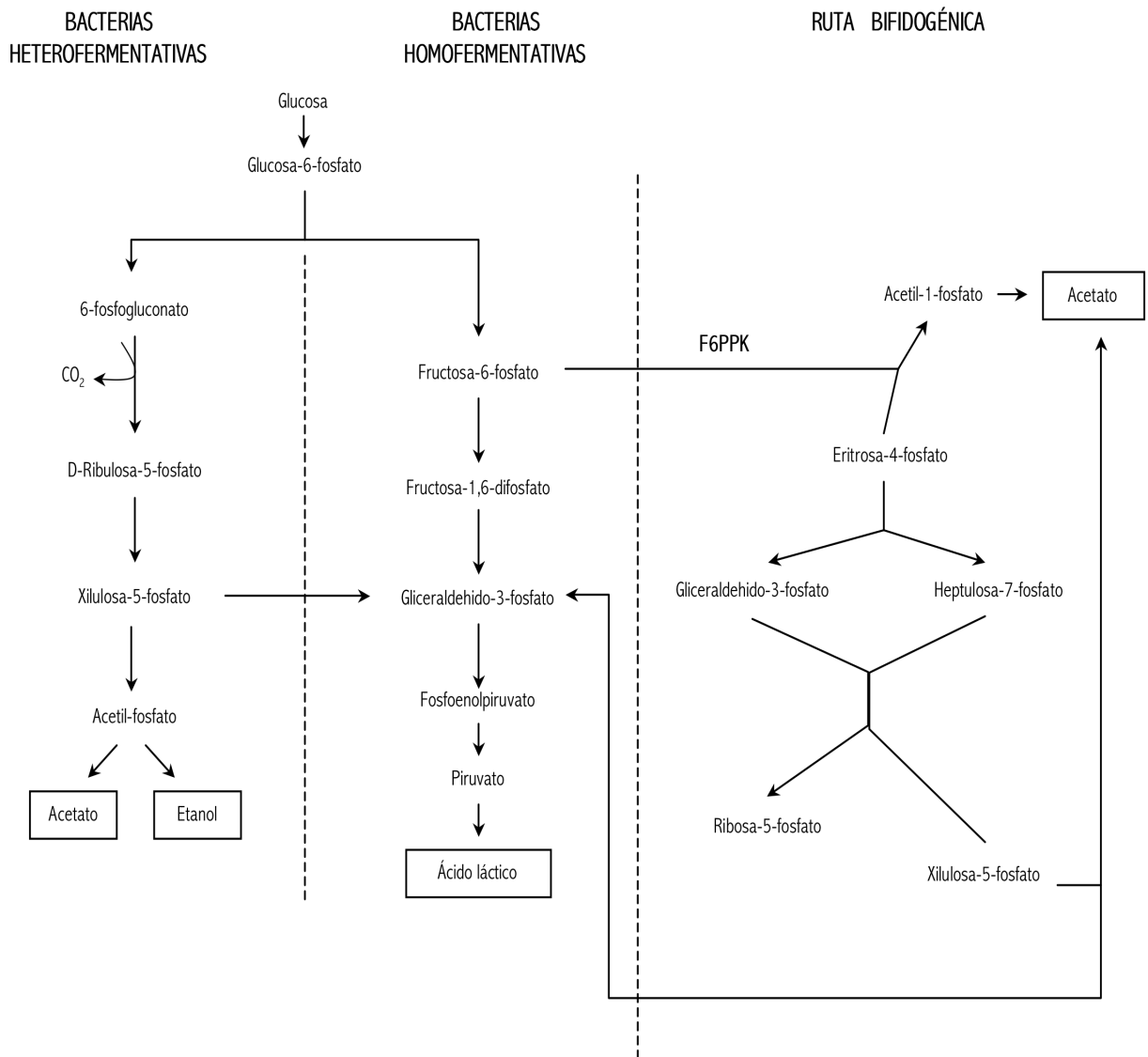


Figura 3. Metabolismo de carbohidratos por bacterias ácido lácticas y bifidobacterias.

En esta heterofermentación está involucrada una molécula de glucosa que se fosforila para formar una molécula de fructosa-6-fosfato. Ésta se rompe en dos moléculas de 4 y 2 átomos de carbono respectivamente: eritrosa-4-fosfato y acetil-fosfato. La formación de acetato a partir del acetil-fosfato es paralela a la formación de una heptosa-7-fosfato a partir de la unión de la eritrosa-4-fosfato con una triosa derivada de otra molécula de fructosa-6-fosfato. Posteriormente, esta heptosa es dividida en 2 moléculas de acetato y una molécula de piruvato que posteriormente se convierte en lactato. En la ruta bifidogénica, se producen 2.5 ATP por mol de glucosa, en las rutas convencionales de bacterias ácido lácticas, homo y heterofermentativas el rendimiento de ATP es menor. Por lo tanto, el balance general de la ruta bifidogénica es:



La formación de acetato y lactato como principales productos de la ruta bifidogénica es importante por los beneficios que las bifidobacterias confieren a la salud del hombre ya que se sabe que el acetato producido en el intestino, es transportado al hígado donde es utilizado para formar ATP. Mientras que el lactato posee actividad antimicrobiana contra un gran número de bacterias patógenas (Roberfroid y col., 1995).

En algunos estudios con ratas, se ha encontrado que al ser alimentadas con inulina, se producen bajas concentraciones de metano pero una cantidad significativa de gas hidrógeno, además de producirse ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato así como lactato a diferencia de las ratas que consumieron otras fibras como salvado de trigo, cáscaras de chícharo, avena, semillas de cacao y fibra de zanahoria (Davidson y col., 1998).

Los ácidos grasos de cadena corta, son aniones que juegan un papel esencial en la región del colon ya que afectan la morfología y función de los colonocitos. Al estimular la absorción de sodio y agua, estos compuestos minimizan los efectos de la diarrea, también ayudan a mejorar la motilidad del ileon e incrementan la proliferación celular así como también aumentan la mucosa en el flujo sanguíneo. Aunado a todo esto, los ácidos grasos de cadena corta, son absorbidos a través de las células epiteliales del colon al flujo sanguíneo, lo que se vuelve una fuente de energía y de regulación en varios procesos metabólicos del huésped (Reyed y col, 2007).

Varios estudios han demostrado la preferencia de las bifidobacterias por ciertos sustratos como galacto-oligosacáridos e inclusive, algunas enzimas sintetizadas por bifidobacterias al crecer en estos sustratos han sido bien caracterizadas. No obstante, existe poca información del metabolismo y cinética de fermentación de bifidobacterias al utilizar diferentes fuentes de carbono (Rossi y col., 2005).

Dedido a la falta de información específica, es importante conocer el comportamiento y metabolismo de estas bacterias al crecer en un medio de cultivo relativamente simple para posteriormente hacer inferencias de lo que en realidad sucede en un hábitat natural tan complejo como lo es el colon. Así mismo, es importante conocer los mecanismos moleculares por medio de los cuales estas bacterias logran llegar al intestino en cantidad suficiente como para implantarse y colonizar su superficie, así como conocer cuáles son los sustratos ideales, particularmente, los carbohidratos no digeribles que puedan proporcionar cantidades óptimas de sustrato para la nutrición y desarrollo de las bacterias del colon, activando la producción de ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico y energía (Redondo, 1999).

2.7 PREBIÓTICOS

Los oligosacáridos son carbohidratos de cadenas relativamente cortas que están presentes en la naturaleza. Se encuentran típicamente en plantas y también han sido detectados en pequeñas cantidades como azúcares libres o gluco-conjugados en la leche humana y en el calostro de varios animales (Bucke y Rastall., 1990).

Estos compuestos, pasan sin ser digeridos a través del intestino delgado hasta el colon, ya que son resistentes a la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas (α -glucosidasa, maltasa, isomaltasa y sacarasa) específicas para enlaces glucosídicos alfa (Trowell, 1967; Rojas, 1994). Estos compuestos al llegar al colon se vuelven disponibles para las bacterias que habitan esta región. Las bacterias que son estimuladas por estos compuestos son benéficas por naturaleza entre las que se encuentran principalmente *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Gibson y col., 1999, 2004). Se ha comprobado que estimulando selectivamente el crecimiento de ellas, se eleva el potencial de salud del huésped (Cagigas y Blanco, 2002).

El término *prebiótico* fue definido en 1995 como *"ingredientes alimentarios no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de una o de un limitado grupo de bacterias en el colon y, de este modo, mejoran la salud del organismo hospedador"* (Gibson y Roberfroid, 1995).

Para que una sustancia (o grupo de sustancias) pueda ser definida como prebiótico, debe cumplir los siguientes requisitos: Ser de origen vegetal, formar parte de un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas, no ser digerida por las enzimas digestivas, ser fermentada por las bacterias colónicas, ser osmóticamente activa (Maté, 1996).

Entre los oligosacáridos naturales no digeribles que cumplen con los criterios de los alimentos colónicos; los fructooligosacáridos son los únicos productos actualmente reconocidos y empleados como ingredientes alimenticios y que cumplen con los requisitos para ser clasificados como prebióticos. En la tabla 2 se muestran algunos prebióticos que se han añadido a dietas, su origen y los efectos sobre la flora del colon.

Tabla 2. Selección de prebióticos añadidos o presentes en la dieta.

<i>Clase de compuesto</i>	<i>Efecto</i>	<i>Efecto sobre la flora colónica</i>	<i>Efecto sobre *AGCC/pH</i>	<i>Duración, dosis del tratamieto</i>	
<i>Oligosacaridos</i>					
Fructanos	Inulina de la raíz de achicoria	+++	+ Bifidobacteria, Lactobacilli	Sí	4 – 40 g/día
	Oligofructosa, fructano sintético		- Bacteroides, clostridia		
<i>Galacto-oligosacaridos (GOS)</i>	Trans GOS, natural GOS de leche humana	++(+)	+ Bifidobacteria, Lactobacilli	Sí	3 – 10 g/día
Oligosacaridos de glucosa	Dextranos y oligodextranos	++	+ Bifidobacteria, Lactobacilli	Sí	_____
	Polidextrosa	++(+)	+ Bifidobacteria, Lactobacilli - Bacteroides	Sí	4-12 g/día
	Isomalto-oligosacáridos	++(+)	+ Bifidobacteria,	Sí	13,5 g/día, 2 semanas
<i>Xilo-oligosacáridos</i>					
Oligosacáridos de soya	Rafinosa, estaquiosa	++ ++(+) +	+bifidobacteria +Bofodobacteroa Bacteroides/eubacteria (dosis pequeña) -Clostridia	Sí Sí	3 – 10 g/día 3 semanas
<i>Otros oligosacáridos</i>	Arabinosilanos (grano de trigo, cebada: harina)	+	?	Sí (lento)	?
Otros Almidón resistente	Tipo 2 y 3; de frijoles, papas, plátano y otros	+	+ Bifidobacteria ('cerdos)	Sí	?
<i>β-glucanatos</i>	De granos de avena	+	?	Sí	?
Polímeros de galactomanosa	De goma de guar	(+)	+ Bifidobacteria, Lactobacilli	Sí	7 g /día 2 semanas

*AGCC: ácidos grasos de cadena corta.

Algunos oligosacáridos de bajo peso molecular han sido objeto de estudios recientes porque además de ser polisacáridos no provenientes del almidón, presentan la propiedad de ser la fuente de carbono para las bacterias del colon. Cuando son ingeridos, estos carbohidratos no son digeridos en el intestino delgado y llegan a la región ileocaecal prácticamente sin ser modificados (Oku y col., 1984; Nilsson y col., 1988; Ellegård y col., 1997). Cuando llegan al colon, se eleva el porcentaje de sustratos disponibles para las bacterias que ahí habitan, lo que provoca una disminución del pH por la producción de ácidos grasos de cadena corta, esto favorece la eliminación de microorganismos patógenos (Morisse y col., 1993)

Estos oligosacáridos están formados por diferentes azúcares como fructosa, galactosa, xilosa, isomaltosa, glucosa, entre otras. Son llamados fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos y oligo-dextranos, respectivamente. En la tabla 3 se muestra la estructura molecular de algunos oligosacáridos.

Tabla 3. Oligosacáridos prebióticos.

<i>Clase de oligosacárido</i>	<i>Estructura molecular</i>	<i>Tipo de enlace</i>	<i>Nombre comercial</i>
Fructo-oligosacáridos (Inulina)	(Fr) _n -Glu	β-1,2	Meiologo
Galactooligosacáridos	(Ga) _n -Glu	β -1,4 y β-1,6	Actilight
Isomalto-oligosacáridos	(Glu) _n	α-1,6	Isomalto 900
Lactulosa	Ga-Fr	β-1,4	MLSP/C
Frijol de Soya	(Ga) _n -Glu-Fr	α-1,6	Soya
Lactosacarosa	Ga-Glu-Fr	β-1,4	Nyuka-Origo
Xilo-oligosacáridos	(Xy) _n	β-1,4	Xilo-Oligo
Gentio-oligosacáridos	(Glu) _n	β-1,6	Gentosa

*Ga, galactosa; Glu, glucosa; Fr, fructosa; Xy, xilosa.

(Gibson y Rastall, 2006)

2.7.1 FRUCTO-OLIGOSACÁRIDOS Y FRUCTANOS TIPO INULINA.

El fructano es un nombre general utilizado para cualquier carbohidrato donde la mayoría de sus enlaces glucosídicos son tipo fructosil-fructosa. Son sintetizados por las plantas a partir de la sacarosa y generalmente presentan una unidad de glucosa al final de cadena. Los fructo-oligosacáridos están bien establecidos como compuestos prebióticos (Gibson y Rastall, 2006).

La inulina es un fructo-oligosacárido que se extrae de plantas de distintas familias *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae* y *Compositae* (ajo, poro, maíz dulce o lechuga) aunque la principal fuente de inulina es la achicoria o endivia (*Cichorium intybus*). De esta planta se obtiene un polisacárido complejo $[\alpha\text{-D-glucopiranosil-(}\beta\text{-D-fructofuranosil)}^{n-1} \beta\text{-D-fructofuranósido}]$, con un número de fructosas comprendidas entre 2 y 70.

La inulina nativa es procesada en la industria alimentaria y transformada en fructanos (fructooligosacáridos ó FOS) de cadena corta con un grado de polimerización entre 2 y 10 (normalmente 5) como resultado de la hidrólisis enzimática parcial por la inulinasa (EC 3.2.1.7).

Estos ingredientes, además de tener las propiedades clásicas de las fibras alimentarias para regular el tránsito intestinal, contribuyen a la mejor absorción del calcio, a la estimulación de las defensas naturales de la flora intestinal (efecto bífidus) y a reducir el colesterol y los niveles de azúcar en sangre.

Las principales propiedades de la inulina y oligofructosa son, en primer lugar, su efecto beneficioso común a la fibra, ya que la ingesta de estos compuestos a través de los alimentos contribuye a mejorar la protección y el equilibrio del intestino, estimulando el desarrollo de la flora intestinal a través de las bifidobacterias. En segundo lugar, mejora la asimilación y biodisponibilidad del calcio, lo que se traduce en una reducción de la

osteoporosis, ya que se ha demostrado que ambos activos vegetales aumentan tanto la densidad mineral del hueso como la masa ósea. En tercer lugar, actúan de forma positiva sobre el sistema digestivo ayudando a regular el tránsito intestinal. Por todo esto, la inulina y la oligofruktosa son recomendables para todas las personas: niños y adolescentes en etapa de crecimiento, mujeres en gestación y personas de edad avanzada.

La oligofruktosa también controla el estreñimiento favoreciendo el desarrollo de bifidobacterias y de *Bacillus subtilis* en el colon, evita el crecimiento de microorganismos putrefactivos, estimula la síntesis de vitaminas del complejo B, tiene un efecto antidiabético (por su activa potencia hipoglicémica para reducir el nivel de azúcar en la sangre), reduce la cantidad de colesterol y triglicéridos (contra la arterioesclerosis), y aporta bajo contenido calórico.

2.7.2 GALACTO-OLIGOSACÁRIDOS.

Los galacto-oligosacáridos son obtenidos por síntesis química a partir de lactosa. Una variedad de ellos se han utilizado como edulcorantes bajos en calorías, como aditivos en alimentos y cosméticos. Los galacto-oligosacáridos son más estables que los fructo-oligosacáridos, son bifidogénicos y no cariogénicos (Shin y col., 1998; Sako y col., 1999).

2.7.3 XILO-OLIGOSACÁRIDOS.

Los xilo-oligosacáridos son cadenas de moléculas de xilosa unidos por enlaces β -1,4 y consisten principalmente de xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa, se encuentran naturalmente en los germinados de bambú, frutas, vegetales, leche y miel (Vázquez y col., 2000). Éstos se obtienen también por hidrólisis química de xilanos y polidextrinas o pirodextrinas.

Los xilo-oligosacáridos pueden ser metabolizados por *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en cultivos puros. En experimentos con ratas, se ha observado que estimulan el crecimiento de bifidobacterias del colon y en el ser humano promueven selectivamente el crecimiento de bifidobacterias (Gibson y Rastall, 2006)

Los xilo-oligosacáridos se han empleado en Europa y Estados Unidos como condimentos alimenticios en helados, postres, galletas, pastas y alimentos para niños, calculándose su consumo por persona entre 1 a 7 gramos diarios.

2.7.4 ISOMALTO-OLIGOSACÁRIDOS.

Son compuestos de monómeros de glucosa unidos por enlaces α -1,6 y ocasionalmente α -1,4. Los isomalto-oligosacáridos se encuentran naturalmente en varios alimentos fermentados como el sake, salsa de soya y miel (Yun y col., 1994).

2.8 EFECTOS BENÉFICOS

Más allá de los beneficios nutricionales, los probióticos y prebióticos presentan aplicaciones farmacéuticas importantes. De hecho, un aumento en los niveles de bacterias que crecen en el intestino humano, ha sido relacionado como un agente causal o como factores que mantienen no solo un estado de enfermedad en el colon sino también desórdenes sistémicos.

Hasta el momento, se ha visto que las bacterias intestinales se encuentran íntimamente involucradas en el metabolismo de los nutrientes y su manipulación puede realizarse mediante la ingestión oral de bacterias vivas en alimentos como el yogurt o a través de una estimulación selectiva de su crecimiento vía complementos alimenticios específicos o funcionales (Cummings y Macfarlane, 1997).

La incorporación de prebióticos específicos como carbohidratos dietéticos, logra estimular el crecimiento de ciertos microorganismos benéficos al huésped y pueden por lo tanto, alterar el equilibrio de la flora normal del colon, favoreciendo un crecimiento de microorganismos como el caso de las bifidobacterias (Gibson y col., 1995; Cummings, 1998).

En los últimos 20 años se ha incrementado el interés comercial y científico en el género *Bifidobacterium* por el gran número de efectos benéficos que se le ha atribuido ya que estas bacterias, combaten enfermedades diarreicas, mejoran la intolerancia a la lactosa, ayudan a combatir infecciones intestinales, colitis ulcerativa, estreñimiento, estimulan el sistema inmune, reducen colesterol en sangre e inclusive juegan un papel muy importante en la prevención del cáncer de colon. (Leahy y col., 2005)

2.8.1 MEJORAMIENTO DEL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL

El estreñimiento es un trastorno significativo para mucha gente, y es un malestar que prevalece entre la gente de edad adulta. Este padecimiento, cuando es una constipación leve puede corregirse a través del consumo de productos lácteos fermentados por bifidobacterias (Wanitschkey col., 2003). En mujeres voluntarias que consumieron leche fermentada con *Bifidobacterium spp.*, los tiempos de tránsito en el colon sigmoideo se aceleraron. No se pudo observar el mismo efecto con el yogurt tradicional (sin bifidobacterias), por lo que se demuestra la efectividad de estas bacterias para incrementar la motilidad del colon. Se ha demostrado, que la ingestión de fibra dietética insoluble conduce a la reducción de los tiempos de tránsito intestinal, lo que conduce a que los posibles agentes carcinógenos fecales tengan menores oportunidades de interacción con el epitelio intestinal. Las leches fermentadas por bifidobacterias pueden actuar de manera similar.

2.8.2 REDUCCIÓN EN EL RIESGO DE CONTRAER CÁNCER

Se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas y los productos fermentados elaborados con ellas, tienen una actividad potencial anticarcinogénica. *B. longum* y *B. infantis* son agentes efectivos contra los tumores. Su mecanismo de acción se debe a la supresión de las enzimas bacterianas, a la activación del sistema inmune del huésped y a la reducción del pH intestinal. Las bifidobacterias son capaces de metabolizar los compuestos carcinogénicos o reaccionar con las enzimas que desarrollan la formación de carcinógenos. Un estudio mostró que existe una relación entre especies de bifidobacterias fecales y el riesgo de contraer cáncer de colon. Dada la posibilidad de que exista un beneficio relacionado a la alta prevalencia de esta enfermedad, el interés científico se ha intensificado en los últimos años, con el objetivo de determinar el papel potencial de las bifidobacterias para reducir el riesgo de contraer cáncer colorectal (Shah, 2001).

Evidencias indirectas en humanos muestran que el consumo de leche fermentada por bifidobacterias conduce a la reducción de los niveles de ciertas enzimas fecales tales como la β -glucuronidasa, estas enzimas se encuentran implicadas en la conversión de procarcinógenos a carcinógenos (Goldin y col., 1993; Ling y col., 1994). Además, los metabolitos de putrefacción fecal tales como el p-cresol, el indol y el amoníaco disminuyeron cuando los sujetos consumieron leche fermentada por *B. longum* y *S. thermophilus*.

Estudios *in vitro* han investigado diversos procarcinógenos y carcinógenos (Abdelali y col., 1995; Cassand y col., 1994). Las bifidobacterias inhiben los nitritos y las nitrosaminas procarcinógenas a través de mecanismos no enzimáticos e intracelulares (Grill y col., 1995). También se unen a las aminas heterocíclicas (carcinógenos que se forman al cocinar la carne roja), y de esta forma, pueden ser eliminadas en las heces (Orrhage y col., 1994).

Más recientemente, el interés se ha enfocado en la posible participación en la reducción del riesgo del cáncer mamario. Un reporte *in vitro* reciente mostró la inhibición del crecimiento de una línea celular de un cáncer mamario humano debido a la leche fermentada por bifidobacterias, demostrando por consiguiente, los efectos anticancerígenos contra el cáncer mamario (Van't Veer y col., 1989; Lê y col., 1986).

2.8.3 REDUCCIÓN DE LA INTOLERANCIA A LA LACTOSA

La intolerancia a la lactosa es un problema que padece un gran porcentaje de la población mundial (50-70%) y se debe a los bajos niveles de β -D-galactosidasa intestinal. La lactosa es una sustancia osmóticamente muy activa y su presencia en el intestino ocasiona la salida de fluidos e iones de la mucosa intestinal hacia el exterior

hasta alcanzar el equilibrio osmótico, provocando diarrea profusa (Marquina y Santos, 2002). Los cultivos tradicionales para la elaboración de yogurt, *L. Delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, contienen cantidades suficientes de β -D-galactosidasa, el cual, ayuda a aliviar los síntomas de la mala absorción de la lactosa al ser hidrolizada. La viscosidad de estos productos es elevada, lo que implica un tránsito lento por el tracto digestivo lo que ayuda a que la lactosa pueda ser digerida (Sanders, 1999).

2.8.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La microflora intestinal ejerce una barrera importante frente a las infecciones. Los mecanismos de acción son muy variados, modifican los niveles de adhesión celular, produciendo sustancias antimicrobianas, estimulan órganos linfoides asociados al tracto intestinal, colonizan de manera competitiva (privando a los patógenos de nutrientes e inhibiendo su adhesión y desarrollo), lo que se ve favorecido por la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y sustancias antimicrobianas conocidas como bacteriocinas (Heller y col., 2001).

Saavedra y colaboradores en 1994 encontraron que los bebés alimentados con una fórmula adicionada con *B. bifidum* y *S. thermophilus* tuvieron una menor incidencia de diarrea hospitalaria y porcentajes menores de infección por rotavirus en comparación con bebés que tomaban una fórmula estándar. Hallazgos similares se reportaron en ratones tratados con *B. bifidum*. (Van't Veer y col., 1989)

Estudios *in vitro* han demostrado el efecto antagonista contra varios patógenos, incluyendo *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, y *Yersinia enterocolitica*. (Fujiwara y col., 1997). Solamente un estudio encontró que no existía efecto inhibitorio de una cepa de *B. bifidum* contra *Helicobacter pylori* (Midolo y col., 1995).

Este efecto antagonista puede ser dado mediante la producción de ácidos acético y láctico, los cuales, disminuyen el pH, que por sí solo tiene un efecto inhibitorio; y además algunas bifidobacterias excretan sustancias antimicrobianas con un espectro de actividad amplio (Gibson y col., 2004).

Aunque los estudios *in vivo* no son fáciles de interpretar dada la dificultad para medir sus efectos deseados, los mecanismos se están comprendiendo mejor a través de varios estudios *in vitro*.

2.8.5 PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES DIARRÉICAS

Las bifidobacterias así como otros probióticos pueden prevenir o controlar la diarrea a través de los efectos del sistema inmune. Además, los microorganismos probióticos pueden prevenir infecciones al competir con los virus o bacterias patógenas por los sitios de unión en las células epiteliales. (Duffy y col., 1994a; Duffy y col., 1994b; Perdigón y col., 1995). Los probióticos también pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas por la producción de bacteriocinas como la nisina (Jack y col., 1995).

2.8.6 ESTIMULACIÓN EL SISTEMA INMUNE

Se ha probado que varios probióticos estimulan el sistema inmune. Los mecanismos de acción no son específicos, lo cual resulta en un aumento de la respuesta inmune hacia una gran variedad de antígenos.

Las bifidobacterias pueden modular diversos parámetros del sistema inmune, estudios *in vitro* han demostrado la producción de interleucina (IL)-6, IL-1b, y de γ -interferón

(moléculas que sirven como señales entre las células durante la respuesta inmune) en las células mononucleares sanguíneas.

Se ha observado inmunomodulación por *L.acidophilus* y Bifidus, aunque el mecanismo no es claramente entendido (Schiffrin y col., 1995). Se ha reportado que al ingerir probióticos, se estimula la producción de citosina en las células sanguíneas y aumento en la actividad de macrófagos (Marteau y col., 1997). Por otra parte, se ha observado que incrementan la actividad natural de las células del hígado así como los niveles de inmunoglobulinas, en especial, las IgA (Sanders, 1999).

2.8.7 REDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN INTESTINAL

Se calcula que 2 millones de personas en el mundo padecen inflamación intestinal, los síntomas de este trastorno involucran disturbios en los hábitos intestinales y en la inflamación de la mucosa gástrica. El consumo de bifidobacterias ejerce un efecto benéfico en la terapia y profilaxis de esta enfermedad (Gionchetti y col., 2000). Los mecanismos por los que las bifidobacterias ayudan a reducir los síntomas de este trastorno aún no están bien entendidos. (Shanahan, 2002; Mahida y Rolfe, 2004).

2.8.8 REDUCCIÓN DEL COLESTEROL

Estudios recientes han mostrado que el consumo de ciertos cultivos de productos lácteos puede reducir el nivel de colesterol en la sangre. El consumo de leches fermentadas con un alto contenido de bacterias probióticas (10^9), pueden reducir los niveles de colesterol de 3.0 a 1.5g/L en personas hipercolestéremicas (Shah, 2001). El efecto de las bacterias probióticas sobre la reducción del colesterol sanguíneo son aún desconocidos. Una hipótesis sugiere que algunas cepas de *L. acidophilus* pueden asimilar la molécula del

colesterol, esta actividad ha sido reportada *in vitro* (Gilliland y col., 1985). Se ha sugerido que la capacidad que tienen ciertos lactobacilos y bifidobacterias para la desconjugación enzimática de los ácidos biliares, es un mecanismo importante en la regulación de niveles de colesterol sanguíneo en humanos ya que los ácidos biliares desconjugados son más fáciles de excretar (De Smet, 1994).

2.8.9 SALUD UROGENITAL

El tracto urogenital de las mujeres está altamente colonizado por bacterias y por lo tanto, es muy susceptible a infecciones. El consumo oral de ciertos probióticos puede disminuir el desarrollo de infecciones provocadas por *Candida* y bacterias de la vagina. Diferentes estudios han correlacionado la salud vaginal con la presencia de lactobacilos, específicamente productores de peróxido de hidrógeno (Sanders, 1999).

2.9 ESTUDIOS MOLECULARES EN BIFIDOBACTERIAS

Gracias a los avances de la biología molecular, varios grupos de investigación se han dedicado a estudiar el genoma de las bifidobacterias, debido a los beneficios que éstas han presentado sobre la salud del ser humano. Hasta el momento se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares por medio de las cuales ejercen su efecto, a pesar de que *Bifidobacterium* es el género bacteriano más común en el colon humano. Sin embargo, se ha logrado conocer un poco la regulación de la expresión de genes (sobreexpresión o represión) en función de diferentes condiciones, con el fin de comprender como sobreviven en el tracto gastrointestinal y para conocer las interacciones moleculares y funcionales que existen entre ellas y el huésped (De Voos, 2002).

El estudio genético de las bifidobacterias se ha ido incrementando en los últimos 10 años, lo que ha permitido un vertiginoso avance en el conocimiento del metabolismo sobre la flora intestinal, lo cuál no es posible con las técnicas clásicas de microbiología.

Las especies del género *Bifidobacterium* más estudiadas a nivel molecular han sido *B. longum*, *B. breve* y *B. infantis*, aunque la mayoría de los trabajos se han centrado en la identificación de estas especies en diferentes muestras. Por otro lado, la expresión del gen de β -glucosidasa y la actividad de su respectiva enzima, fueron analizadas con experimentos de Northern y Western blot con el fin de elucidar los mecanismos de acción responsables del incremento de la actividad enzimática en presencia de celobiosa como fuente de carbono (Nunoura y col., 1997).

También se han utilizado microarreglos de DNA para la identificación de especies de bacterias intestinales a partir de muestras fecales utilizando como sondas DNA ribosomal de la región 16S marcadas con digoxigenina. Con el desarrollo de esta técnica se han podido detectar las bacterias intestinales dominantes del intestino humano, entre

ellas, las bifidobacterias. Los resultados se confirmaron utilizando métodos de PCR específicos para cada bacteria (Wang y col., 2002).

Hasta el momento, la única especie del género *Bifidobacterium* que se encuentra completamente secuenciada es *B. longum*. Lo cual ha permitido conocer que su genoma está formado por un total de 2.26 Mpb dentro del cual se estima que existen aproximadamente 1730 secuencias codificantes organizadas en un cromosoma circular con un alto contenido de G+C (60%). Con esta secuencia, se han realizado análisis bioinformáticos que revelan ciertas características fisiológicas que podrían explicar de forma parcial, la adaptación de estas bacterias en el colon. Por otra parte, y utilizando también herramientas informáticas, se ha llevado a cabo la predicción de las secuencias de muchas proteínas a partir de las secuencias de nucleótidos, lo que revela de manera inesperada, la presencia de un gran número de proteínas involucradas en el metabolismo de oligosacáridos las cuales están directamente relacionadas con la prevalencia de las bifidobacterias en el colon, y por consiguiente, con sus efectos benéficos (Schell y col., 2002).

Por lo anteriormente expuesto, una caracterización molecular de bifidobacterias es esencial para definir su actividad benéfica y explorar y explotar cualquiera de sus propiedades (MacConaill y col., 2003). Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han enfocado a la identificación y aislamiento de estos microorganismos a partir de heces de niños y adultos utilizando como sondas, regiones de la subunidad 16S del RNA ribosomal ya que la secuencia de este gen es específica para cada especie y permite identificar las especies presentes en una muestra dada (Fasoli y col., 2003; Favier y col., 2003; Vázquez, 2005).

Teniendo como base el genoma de *B. longum* secuenciado, se puede llevar a cabo un ilimitado número de estudios y experimentos que nos permitan avanzar más sobre el conocimiento de este microorganismo así como de las especies relacionadas con él.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de las bifidobacterias como microorganismos probióticos las hace susceptibles de ser estudiadas para conocer a fondo los mecanismos por medio de los cuales ejercen sus efectos benéficos en el ser humano.

Es de suma importancia, estudiar el comportamiento de las bifidobacterias en su ambiente natural, sin embargo, el colon es un sistema bastante complejo por lo que se debe hacer el análisis de forma individual, utilizando diferentes condiciones de cultivo, con el fin de conocer los metabolitos que ejercen los efectos positivos sobre la salud del ser humano, las rutas metabólicas por medio de las cuales se producen, las enzimas involucradas en su síntesis y por lo tanto, los genes que codifican para ellas. Todo esto, nos conduce a estudiar el desarrollo de bifidobacterias durante las diferentes etapas de su crecimiento y la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos.

En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis del crecimiento de *B. infantis* en cuatro diferentes sustratos. Se eligió trabajar con un azúcar simple: glucosa, dos disacáridos: lactosa y sacarosa; y un fructooligosacárido: inulina. Para posteriormente realizar un análisis de la expresión de genes involucrados en la degradación de carbohidratos. Se decidió iniciar con el estudio de la expresión de los genes que codifican para las enzimas lactato deshidrogenasa y acetato kinasa por ser las responsables de la formación de los principales productos de fermentación de bifidobacterias (ácido acético y ácido láctico) y que aparentemente están directamente relacionados con los efectos benéficos que presentan en el ser humano.

4.OBJETIVOS

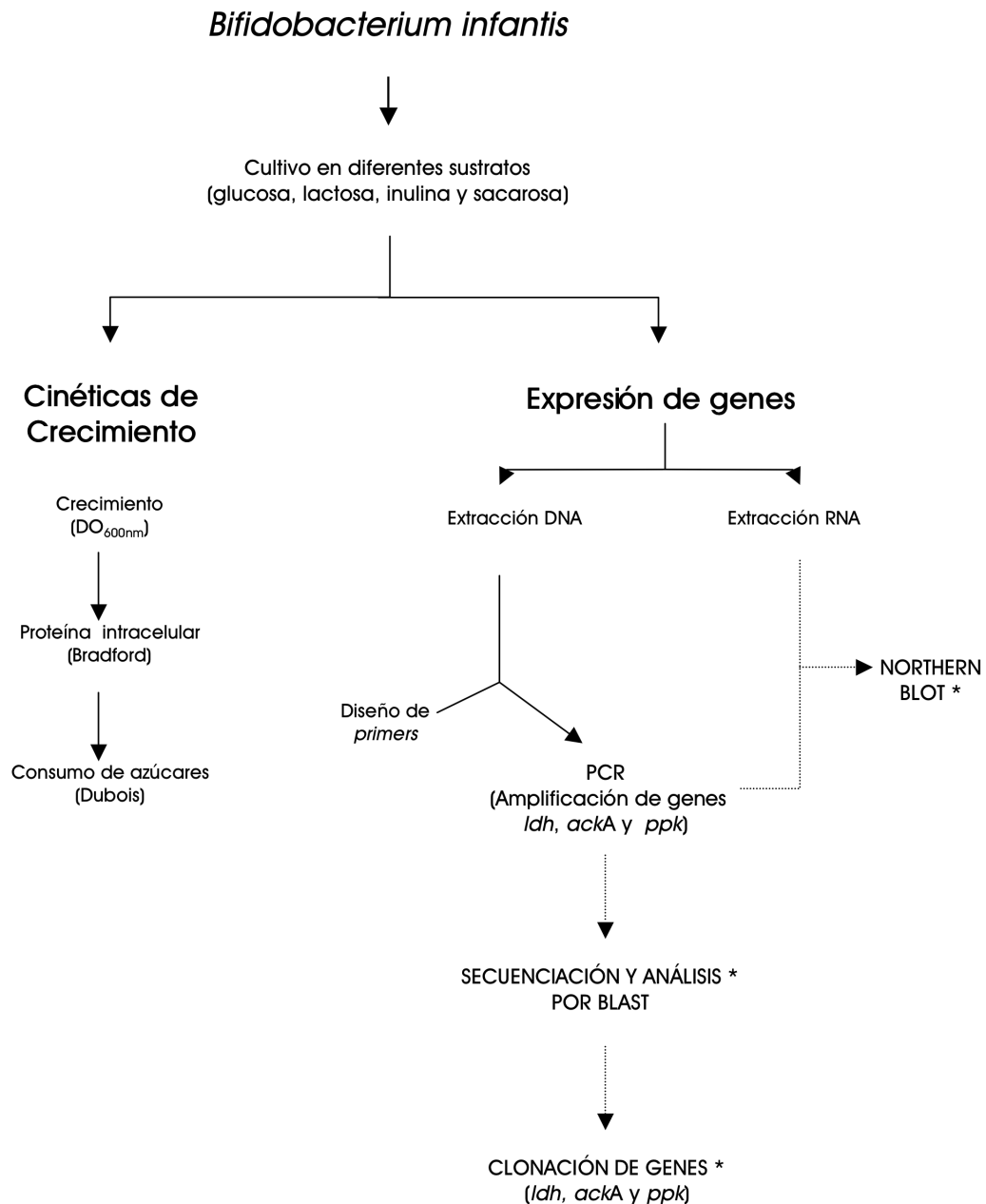
4.1 OBJETIVO GENERAL

Iniciar el estudio de la expresión de los genes lactato deshidrogenasa (*ldh*), acetato kinasa (*ackA*) y fosfoacetolasa (*ppk*), de *Bifidobacterium infantis*.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Realizar cinéticas de crecimiento de *B. infantis* en cuatro diferentes sustratos.
- ✓ Diseñar primers a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes reportados en el Genebank.
- ✓ Extraer DNA genómico de *B. infantis*.
- ✓ Optimizar las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los genes *ldh*, *ackA* y *ppk*.
- ✓ Purificar los genes amplificados por PCR.
- ✓ Extraer y purificar RNA total de los cultivos de *B. infantis* en cada fase de su crecimiento: lag, log y estacionaria.

5. ESTRATEGIA GENERAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MICROORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Bifidobacterium infantis ATCC 17930 se cultivó en condiciones anaerobias en medio TPY (Azaola y col. 1999), agregando glucosa, lactosa, sacarosa y/o inulina al 0.5% como fuente de carbono, el pH se ajustó a 7.0. Se colocaron 80 mL de cada medio de cultivo en frascos viales de 100 mL, la anaerobiosis se produjo burbujeando CO₂ puro para desplazar el oxígeno presente, inmediatamente después, los viales se cerraron herméticamente con tapón de hule y arillo de metal y se esterilizaron a 15 lb de presión durante 15 min. Los cultivos se incubaron a 37°C, con una agitación de 120 rpm durante aproximadamente 50 h.

6.2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

MEDIO TPY	
Componente	Concentración g/L
Azúcar	5
Peptona de caseína	10
Peptona de Soya	5
Extracto de levadura	2.5
Tween 80	1 mL
L-cisteína	0.5
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
FeCl ₃	0.003
K ₂ HPO ₄	2
CaCl ₂	0.15

6.3 CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN

Para llevar a cabo las cinéticas de fermentación, cada medio de cultivo se inoculó con *B. infantis* a una densidad óptica inicial de 0.05 ($\lambda_{600 \text{ nm}}$). Los cultivos se monitorearon tomando muestras de 1 mL cada 2 h y se determinó crecimiento, proteína soluble y consumo de azúcares en cada punto.

Adicionalmente, se tomó una muestra de 5 mL en cada fase de crecimiento (lag, log y estacionaria) para la extracción de RNA total.

6.3.1 CRECIMIENTO

Para la determinación del crecimiento, cada muestra se analizó en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, USA), a una $\lambda_{600\text{nm}}$ con celdas desechables (Brad UV) utilizando el mismo medio de cultivo como blanco.

6.3.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Para la determinación de proteína, se utilizaron 500 μL de muestra, se centrifugó a 5000 rpm/5 min en una micro centrífuga (Eppendorf *mini spin plus*, Alemania). El sobrenadante se reservó para la cuantificación de azúcares totales. Las células se lavaron 2 veces con dH_2O , el paquete celular se resuspendió en 200 μL de TRIS 0.1M pH 7.0. Posteriormente, las células se lisaron en un disruptor (Genie Disruptor Scientific, USA) durante 2 min, con 100 μL de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro (Glass Vidas), inmediatamente después los tubos se colocaron en hielo, (este ciclo: lisis y enfriamiento se repitió 3 veces con el fin de ayudar a romper las células). El lisado se centrifugó a

14000 rpm/10 min, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína soluble por el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (BioRad). Se realizó una curva estándar con albúmina de suero bovino (Sigma) en un intervalo de 0 a 1 mg/mL.

6.3.3 CONSUMO DE AZÚCARES TOTALES

Para la determinación de azúcares totales se utilizaron 20 μ L del sobrenadante obtenido en el apartado 6.3.2. Se colocaron en un tubo de vidrio y se agregaron 180 μ L de dH₂O, se mezcló con vortex (Termolyne Maxi mix plusTM USA). Inmediatamente después se adicionaron 200 μ L de fenol al 5% y 1 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente y se leyó en un espectrofotómetro a 490 nm (Dubois y col., 1956).

6.4 EXTRACCIÓN DE RNA

6.4.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA

Se utilizó el kit RNeasy (Qiagen) y se siguió el protocolo el cual consistió en lo siguiente: se tomaron 5 mL de cada uno de los cultivos de *B. infantis* en los diferentes sustratos (glucosa, lactosa, inulina y sacarosa) en las fases lag, logarítmica y estacionaria (8, 20 y 48 h respectivamente). Cada muestra se centrifugó a 5000 rpm/5 min para obtener las células (no más de 1×10^9) y se quitó el exceso de medio con una pipeta. El pellet se resuspendió en 100 μ L de regulador TE con 3 mg/mL de lisozima (Research Organics) y se mezcló vigorosamente con vortex, se incubó durante 10 min a 37°C y se mezcló cada 3 min. Después de la incubación se agregaron 350 μ L de regulador RLT (por cada mL de RLT se agregaron 10 μ L de β -mercaptoetanol) y 250 μ L de etanol absoluto, se mezcló con pipeta. La mezcla se colocó en una columna y se centrifugó a 10000 rpm/15 s, el filtrado fue desechado y se agregaron 700 μ L de solución RW1 en la columna, se centrifugó a 10000 rpm/15 s. La columna se colocó en un tubo nuevo y se agregaron 500 μ L de solución RPE, se centrifugó a 10000 rpm/2 min, la columna se colocó en un tubo eppendorf nuevo y se eluyó con 30 μ L de agua libre de RNAsas centrifugando a 14000 rpm/1 min.

6.5 AMPLIFICACIÓN DE GENES

6.5.1 DISEÑO DE PRIMERS

Los primers se diseñaron a partir las secuencias nucleotídicas de los genes de *ldh*, *ackA* y *ppk* de *B. longum* reportada en el banco de genes (Genebank). Se eligieron 16 nucleótidos del inicio y 16 nucleótidos del fin de la región codificante de cada uno de los genes. Éstos fueron sintetizados por la compañía Bioselec S.A de C.V.

6.5.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA

Se utilizó un cultivo de *B. infantis* de 45 mL en medio TPY glucosa al 0.5% con una densidad óptica de 3.0, el cual se centrifugó a 5000 rpm/5 min, el pellet se lavó 2 veces con Tris 0.1M pH 7, posteriormente se agregaron 500 mL de Tris 0.1M y 100 µL de perlas de vidrio, las células se lisaron en disruptor durante 2 min, inmediatamente después los tubos se colocaron en hielo, (la lisis y el enfriamiento se repitió 3 veces de manera alternada). Se centrifugó a 14000 rpm/15 min y el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf nuevo, inmediatamente después se agregaron 500 µL de fenol saturado con 10 mM de Tris-HCl (Sigma), el tubo se mezcló suavemente y se centrifugó a 3000 rpm/3 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 500 µL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma), nuevamente se mezcló suavemente y se centrifugó a 3000 rpm/3 min, se recuperó la fase acuosa y se agregaron 3 volúmenes de isopropanol y 1/10 de acetato de sodio 3M, esta mezcla se centrifugó a 14000 rpm/20 min, se desechó el sobrenadante y el pellet se lavó con 200 µL de etanol absoluto frío, se centrifugó nuevamente y se desechó el etanol, el DNA se disolvió en 30 µL de agua estéril. Se observó en un gel de agarosa al 1%.

6.5.3 PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa se prepararon disolviendo 0.2 g de agarosa en 20 mL de dH₂O en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, llevando a ebullición en un horno de microondas. Posteriormente se agregaron 0.4 mL de TAE 50X y se llevó a un volumen de 20 mL con dH₂O. Esta mezcla se vació en el molde, una vez solidificado el gel, se cargaron las muestras con 1/10 de regulador de muestra. Las muestras se hicieron migrar a 50 V, posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio y el DNA se observó en un transiluminador con luz ultra violeta.

6.5.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para amplificar los genes *ldh*, *ackA* y *ppk* por PCR se utilizaron 47 μ L de una mezcla de *supermix pcr taq polimerasa* (Invitrogen) cuya composición consiste en: 22 U/mL de Taq DNA Polimerasa, 22mM de Tris HCl a pH 8.4 55mM KCl, 1.65mM MgCl₂, 220 μ M de dGTP, 220 μ M de dATP, 220 μ M de dTTP y 220 μ M de dCTP. A esta mezcla se agregó 1 μ L de cada uno de los primers a una concentración de 10 pmol/mL y 1 μ L de DNA de *B. infantis* como molde, a una concentración de 20 ng/ μ L. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Thermo, USA). Las condiciones de reacción se muestran en la figura 4. Después de la reacción, las muestras se observaron en un gel de agarosa al 1% .

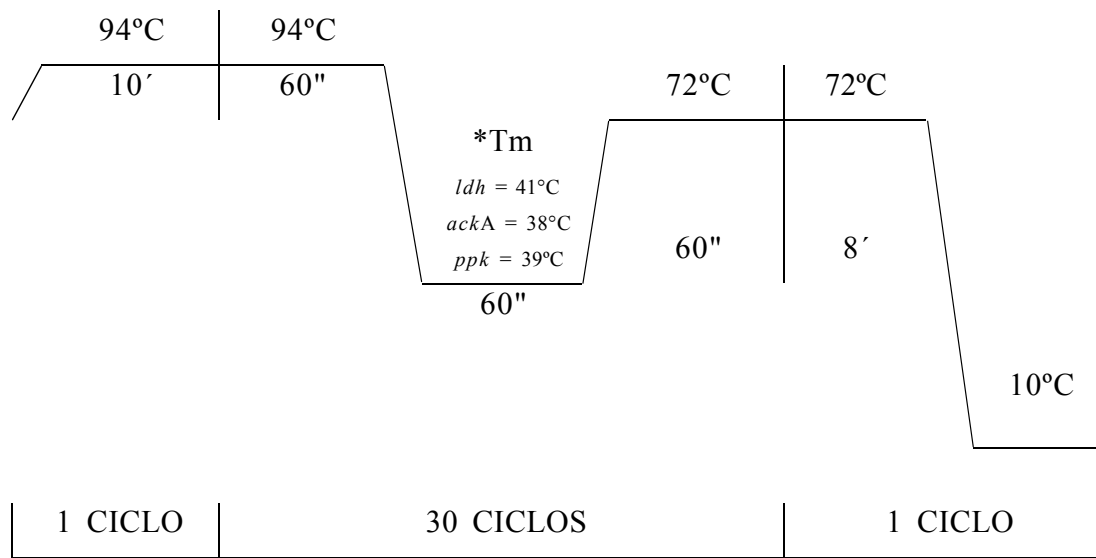


Figura 4. Condiciones de reacción para amplificar por PCR los genes *ldh*, *ackA* y *ppk* de *B. infantis*.

6.5.5 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Se utilizó el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) y se siguió el protocolo que consistió en cortar la banda del gel y colocarla en un tubo eppendorf, al cual se le agregaron 300 μ L de solución QX1, se incubó a 50°C hasta que el gel se fundió completamente. La muestra se colocó en una columna Qiaquick y se centrifugó a 14000 rpm/1 min, posteriormente el filtrado se descartó y se adicionaron 700 μ L de solución PE, se centrifugó a las mismas condiciones. Con el fin de eliminar completamente la solución PE se centrifugó nuevamente durante 1 min, la columna se colocó en un tubo nuevo y se adicionaron 30 μ L de solución EB. El DNA fue recuperado en un tubo nuevo libre de DNAsas, centrifugando a 14000 rpm/1 min.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Todos los medios fueron inoculados con un cultivo fresco de *B. infantis* de 24 h a una DO inicial de 0.05. El crecimiento de *B. infantis* en cada uno de los cuatro sustratos (glucosa, lactosa, inulina y sacarosa) se monitoreó durante aproximadamente 50 h, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una λ de 600 nm.

Las cinéticas de crecimiento en cada sustrato se realizaron 8 veces y cada muestra para determinación de crecimiento, proteína, y consumo de azúcares fue analizada por triplicado. Al realizar un análisis estadístico, se obtuvieron coeficientes de variación menores al 5%, lo cual indica que los experimentos fueron reproducibles y pueden ser utilizados en forma rutinaria en el laboratorio para experimentos futuros.

Los resultados de las cinéticas de crecimiento en los cuatro sustratos, fueron comparados entre ellos y se observó que *B. infantis* presentó una fase lag de aproximadamente 13 h al crecer en lactosa, inulina y sacarosa. Sin embargo, al crecer en glucosa, la fase lag fue de aproximadamente 10 h. Esto nos indica que la bacteria se adaptó al medio de cultivo, de manera similar en los 4 sustratos aunque esto fue más rápido en glucosa (Fig. 5).

En las mismas figuras se muestra que al crecer en glucosa, lactosa y sacarosa, se alcanzó la fase estacionaria entre las 25 y 30 h, sin embargo, cuando creció en inulina, la fase estacionaria fue alcanzada en menor tiempo (aproximadamente 20 h).

En cuanto a la concentración celular, *B. infantis* alcanzó un mayor número de células al crecer en lactosa y sacarosa, lo cual puede deberse a que esta bacteria fue aislada de

niños alimentados con leche que contiene lactosa como principal fuente de carbono. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores, quienes observaron un mayor rendimiento celular en cepas de *Bifidobacterium* en lactosa que en glucosa (Jun y col., 1995; Teak-Bum y col., 2003), por lo que esta cepa, podría ser susceptible de ser utilizada en la elaboración de productos lácteos con el fin de mejorar la intolerancia a la lactosa y digestibilidad de estos productos. Se ha reportado que las bifidobacterias producen grandes cantidades de estas enzimas (Ming y col., 2001).

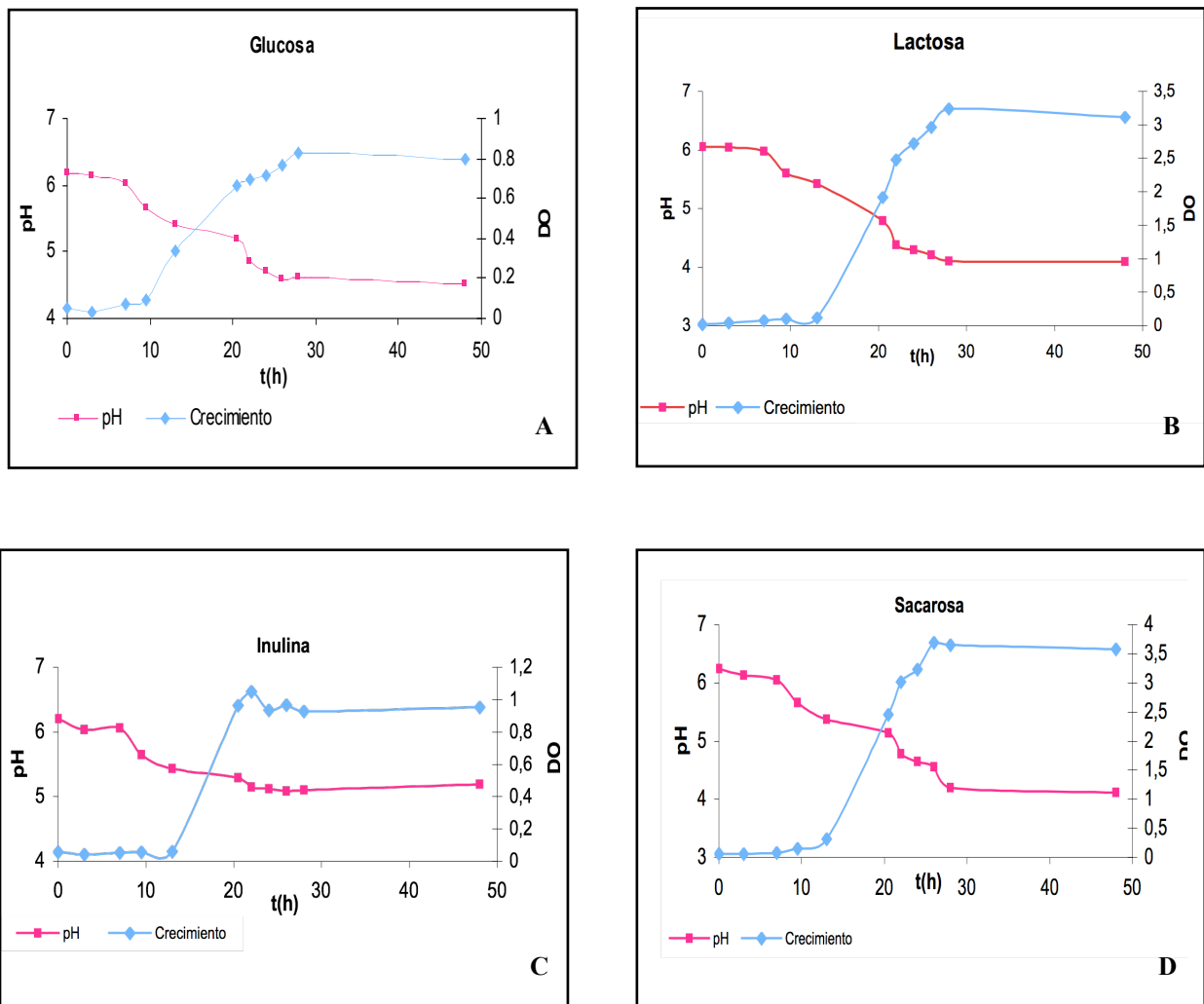


Figura 5. Cinéticas de crecimiento de *B. infantis* ATCC 17930 en medio TPY utilizando A) Glucosa, B) Lactosa, C) Inulina y D) Sacarosa como fuentes de carbono al 0.5%.

Por otra parte, se observó que *B. infantis* alcanzó menor concentración celular al crecer en glucosa e inulina, aunque sorprendentemente en glucosa fue donde se presentó el menor crecimiento que en los otros tres sustratos casi 5 veces menor que en sacarosa, 4 veces menor que en lactosa y menos de la mitad que en inulina (Fig. 5).

La inulina como otros oligosacáridos, ha sido considerada un buen sustrato para la mayoría de las especies de bacteroides y bifidobacterias excepto para *B. bifidum* y algunas cepas de *B. longum* (Bouhnik y col., 1996). La cepa de *B. infantis* utilizada en este estudio, presentó poco crecimiento en inulina, en comparación con el crecimiento en lactosa o sacarosa pero mayor que al utilizar glucosa como sustrato.

La longitud de la cadena de los oligosacáridos es un factor determinante para el crecimiento de algunas especies de bifidobacterias debido a la inherente actividad de la enzima inulinasa, por lo que estos compuestos al no poder ser digeridos más que a través de las bacterias del colon, se puede alterar de manera específica el crecimiento de una comunidad donde predominen ciertas especies de bifidobacterias (Bouhnik y col., 1996).

Estudios de fermentación *in vitro* con monocultivos de diferentes bacterias intestinales, entre ellas algunas bifidobacterias, han demostrado que al crecer en diferentes compuestos, como frijol de soya, oligosacáridos, estaquiosa, rafinosa, fructooligosacáridos y glucosa, las bifidobacterias tienen preferencia por los carbohidratos de alto peso molecular (Saito y col., 1992).

Se ha observado que los 4 sustratos utilizados en este trabajo, son buenas fuentes de carbono para el crecimiento de *B. infantis*, sin embargo diversos estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que los oligosacáridos como la inulina son los sustratos

preferidos de las bifidobacterias (Cummings y col., 1998), lo cual no fue posible apreciar en las gráficas. Esto puede ser debido a que es un medio sintético muy diferente al ambiente del colon en donde estas bacterias se desarrollan óptimamente en simbiosis con otras muchas especies (Reyed, 2007).

El pH óptimo para el crecimiento de bifidobacterias está entre valores de 6.5 y 7.0, sin embargo, con valores de pH de 4.5 a 5.0 y de 8.0 a 8.5 se ha visto que el crecimiento es muy limitado o nulo (Scardovi, 1986). Esto nos hace pensar que el crecimiento de la cepa utilizada en este trabajo, fue inhibido por el pH ya que al crecer en glucosa, lactosa y sacarosa el pH del medio descendió a valores cercanos a 4.0, y al crecer en inulina el pH del medio descendió a valores cercanos a 5.0.

En estudios comparativos de fermentaciones en un lote de *B. adolescentis* al crecer en glucosa, galactosa y lactosa como única fuente de carbono, se observó un crecimiento exponencial continuo y la fase estacionaria se alcanzó cuando la fuente de carbono se agotó después de 17, 9 y 12 h respectivamente. Sin embargo, en estos experimentos el pH se controló y se mantuvo durante toda la fermentación a un valor de 5.5.

7.2 CINÉTICAS DE CONSUMO DE AZÚCARES.

El consumo de azúcares fue determinado por el método de Dubois, el cual ha sido utilizado durante muchos años por su fácil aplicación y resultados confiables, está fundamentado en la determinación de azúcares totales (Dubois, 1956), a diferencia de otros métodos como DNS que sólo sirve para cuantificar azúcares reductores, por lo tanto, este método fue elegido porque dos de los sustratos utilizados en los medios de cultivo no son azúcares reductores.

Los medios de cultivo se prepararon con 5 g/L de cada sustrato, sin embargo, al determinar la cantidad de azúcar en el medio de cultivo antes de ser inoculado con *B.*

infantis (t_0), los datos fueron diferentes, glucosa: 4.8 g/L, lactosa: 3.5 g/L, inulina: 3.4 g/L y sacarosa: 4.5 g/L. Esta diferencia pudo deberse a la sensibilidad del método analítico para cuantificar los azúcares presentes, ya que los medios se prepararon pesando cada sustrato en una balanza granataria.

Al graficar el consumo de azúcares de *B. infantis* en función del tiempo, se observó que glucosa, inulina y sacarosa no se consumieron en su totalidad (Fig. 6, 8 y 9), su consumo fue de 93%, 85% y 92% respectivamente, esto pudo deberse a otros factores que no permitieron que las bifidobacterias continuaran con el crecimiento, como la presencia de oxígeno en el medio o por la producción de algún metabolito o la disminución del pH. En cambio, la lactosa fue consumida al 100% (Fig. 9), lo cual confirma que es el sustrato ideal para *B. infantis*, por haber sido aislada de heces de niños alimentados con leche.

En las mismas gráficas se observa que el crecimiento en sacarosa fue ligeramente mayor: 13% más que en lactosa, esto se explica al observar el consumo de azúcares, ya que *B. infantis* fue capaz de consumir todo el sustrato contenido en el medio preparado con lactosa, en cambio, en el medio con sacarosa, el consumo fue de aproximadamente 83% (Fig. 7 y 9).

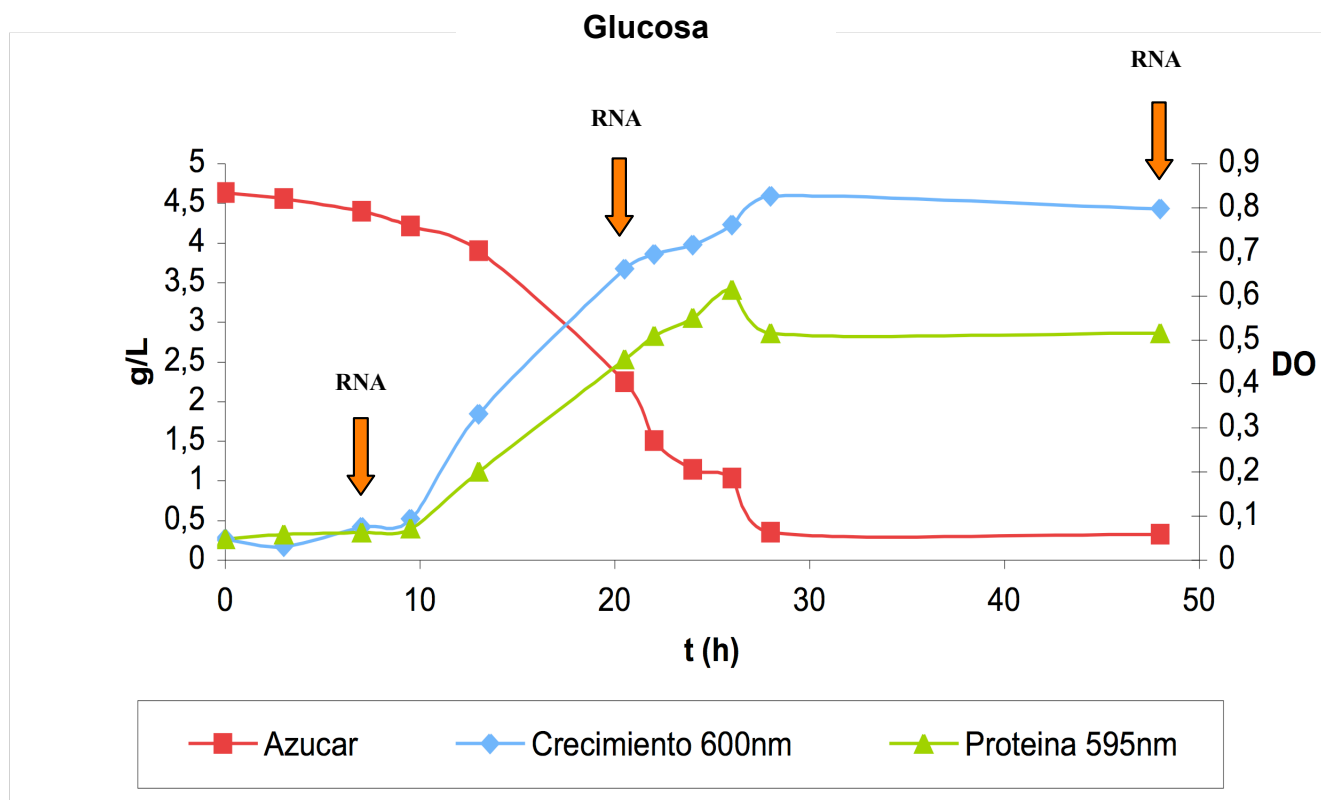
Desjardins y colaboradores (1990) observaron que el crecimiento de *Bifidobacterium ssp.* fue detenido por la acumulación de lactato y acetato en el medio de crecimiento, sin embargo en este trabajo no se monitoreó la presencia de éstos en las cinéticas de crecimiento.

7.3 CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteína de *B. infantis* en las cinéticas de crecimiento se llevó a cabo para corroborar los datos de crecimiento obtenidos por espectrofotometría. Para realizar este experimento, se tomó una muestra de 200 μ L en cada tiempo. Las células se lavaron y se lisaron como se describió anteriormente y la proteína intracelular se determinó por el método de Bradford.

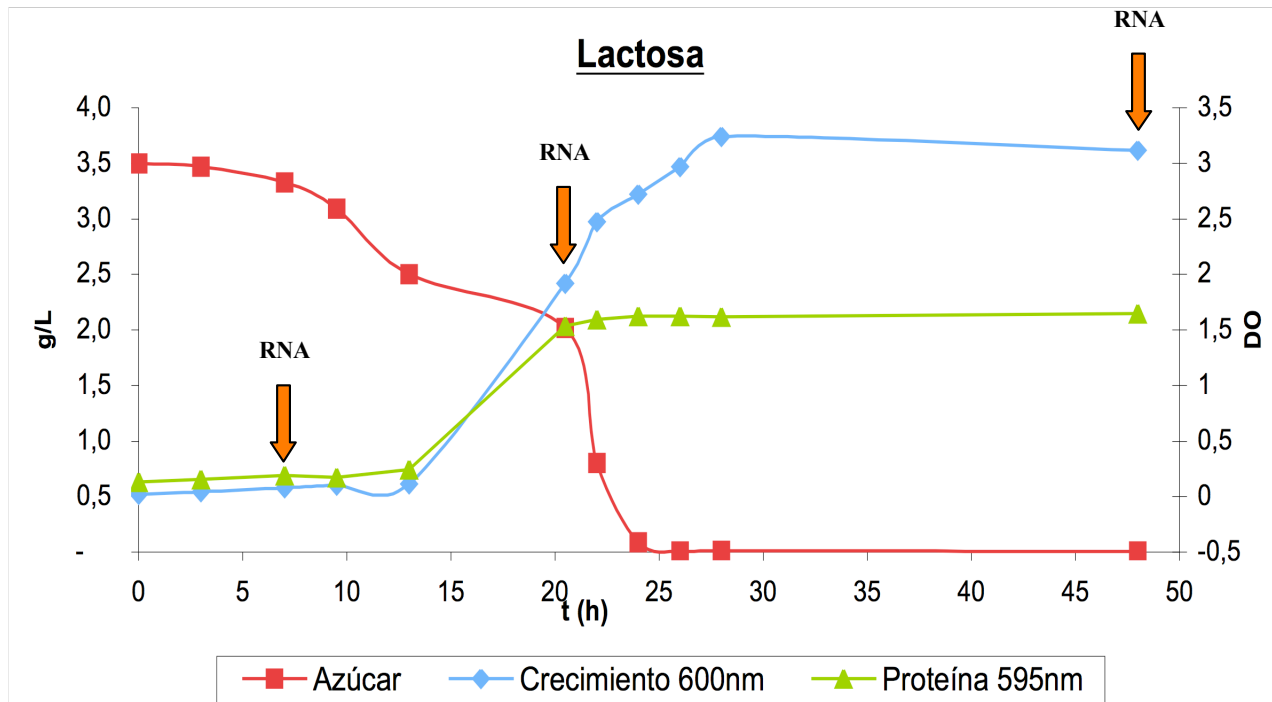
Los datos obtenidos se graficaron, donde se puede observar una tendencia similar a la observada en las cinéticas de crecimiento por espectrofotometría, al igual que en la cinética de crecimiento, la producción de proteínas en los medios de lactosa y sacarosa fue mayor que en la de glucosa e inulina respectivamente (Fig. 6, 7, 8 y 9). Esto confirma los resultados de crecimiento donde se observa mayor densidad celular, tenemos por lo tanto mayor cantidad de proteína intracelular.

De manera paralela, se podría llevar a cabo un análisis de las proteínas producidas por *B. infantis* a lo largo de su crecimiento en cada fuente de carbono, observando el cambio en el patrón de producción de estas proteínas por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), esto con el fin de analizar la expresión de las enzimas lactato deshidrogenasa, acetato kinasa y fosfoetolasa que son codificadas por los genes amplificados en este trabajo.



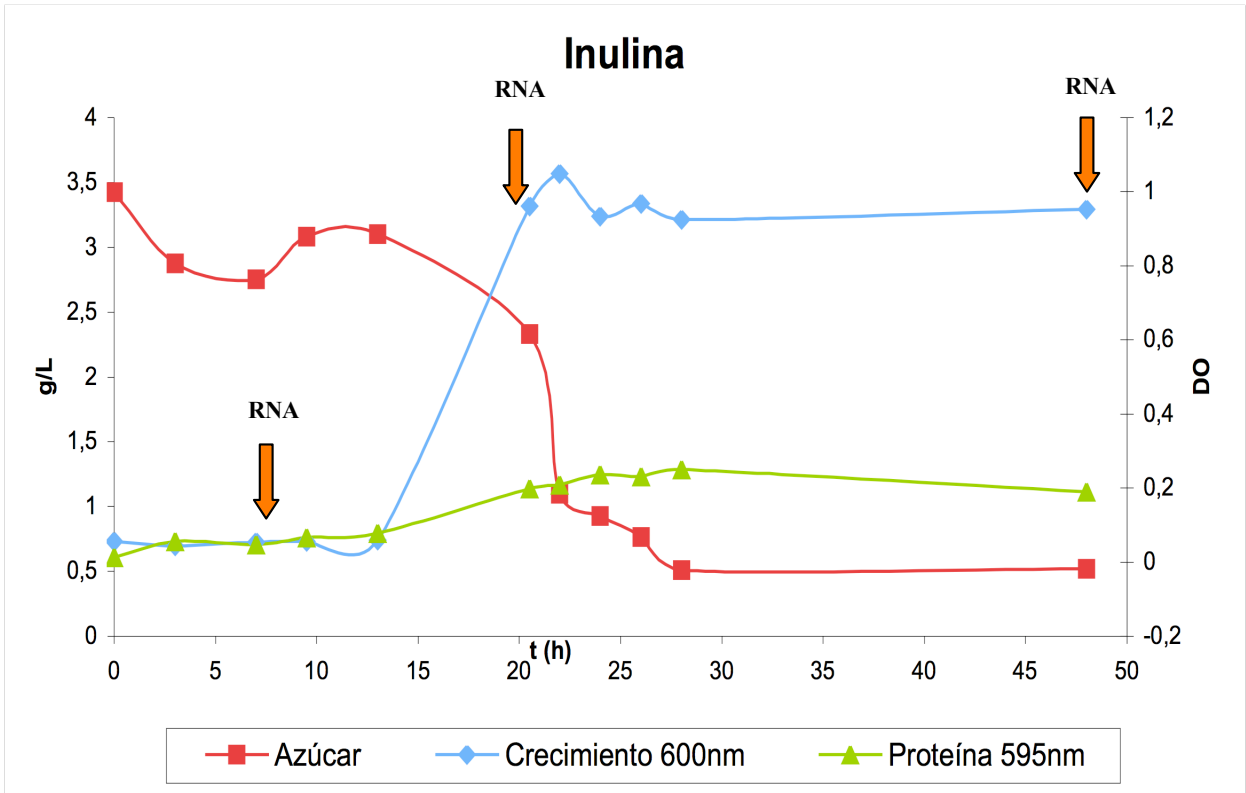
*Las flechas rojas indican las tomas de muestra para la extracción de RNA.

Figura 6. Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de *B. infantis* ATCC 17930 en medio TPY- Glucosa al 0.5%.



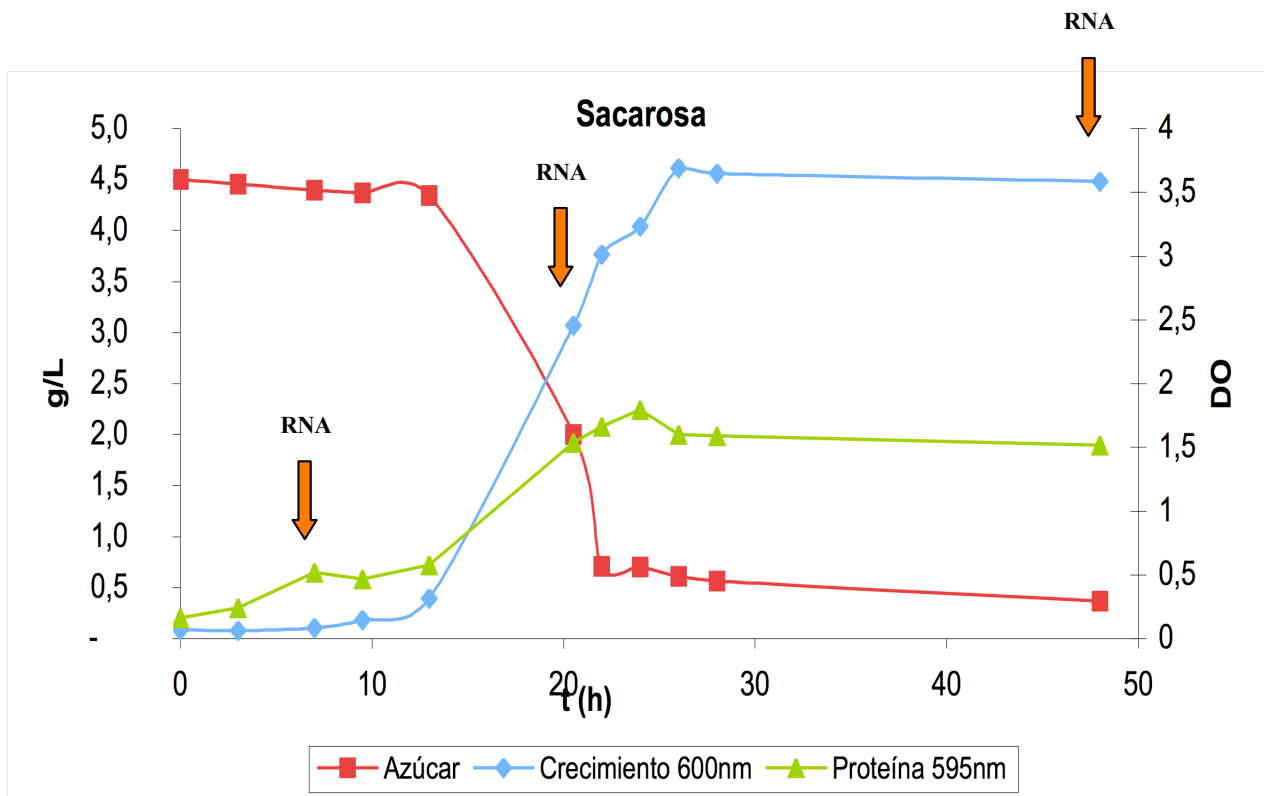
*Las flechas rojas indican las tomas de muestra para la extracción de RNA.

Figura 7. Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de *B. infantis* ATCC 17930 en medio TPY- Lactosa al 0.5%.



*Las flechas rojas indican las tomas de muestra para la extracción de RNA.

Figura 8. Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de *B. infantis* ATCC 17930 en medio TPY- Inulina al 0.5%.



*Las flechas rojas indican las tomas de muestra para la extracción de RNA.

Figura 9. Cinéticas de crecimiento, producción de proteínas y consumo de azúcares de *B. infantis* ATCC 17930 en medio TPY- Sacarosa al 0.5%.

7.4 EXTRACCIÓN DE RNA

Una vez que se llevaron a cabo las cinéticas de fermentación de *B. infantis* utilizando glucosa, lactosa, inulina y sacarosa como fuentes de carbono, se procedió a realizar la extracción del RNA total. Para esto se tomaron muestras de cada cultivo en las diferentes etapas del crecimiento (fases lag, logarítmica y estacionaria), se observó que la calidad del RNA extraído fue muy buena pues los RNA ribosomales se ven íntegros y no presentan degradación (Fig. 10).

Estas muestras de RNA serán utilizados en trabajos posteriores, para realizar experimentos de expresión de genes, ya que los RNA mensajeros pueden ser localizados por hibridaciones con sondas específicas, lo cual nos puede indicar los niveles de expresión en una condición de crecimiento dada. Este tipo de experimentos puede ampliar la información sobre los mecanismos moleculares que son pieza clave de las interacciones benéficas en el tracto gastrointestinal (Schell, 2002).

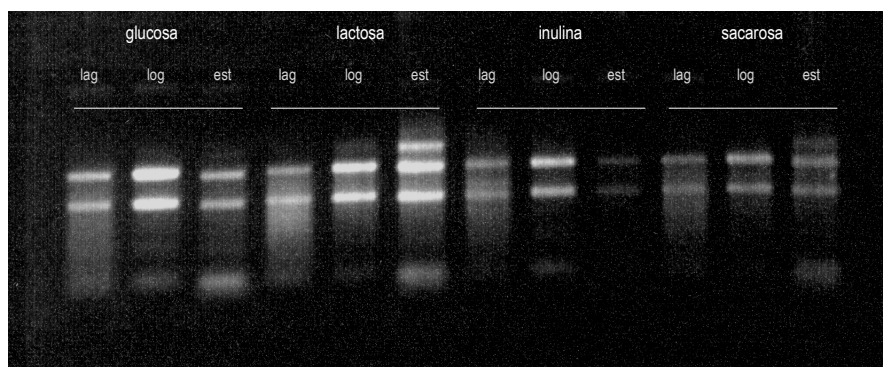


Figura 10. Extracción y purificación de RNA total de *B. infantis* en las fases lag, log y estacionaria de cada cinética de fermentación al utilizar glucosa, lactosa, inulina y sacarosa como sustratos.

7.5 EXTRACCIÓN DE DNA

Se obtuvo DNA de *B. infantis* el cual se utilizó como DNA molde para los experimentos de PCR (Fig. 11).

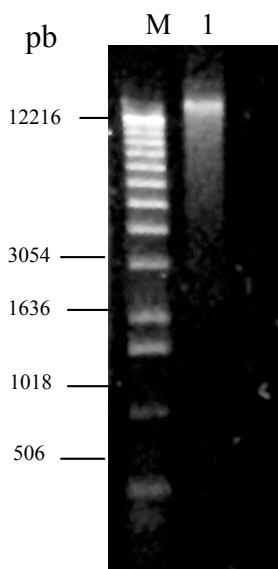


Figura 11. Extracción y purificación de DNA de *B. infantis* a partir de un cultivo en glucosa al 0.5%. Carriles M- marcador de 1kb 1-DNA de *B. infantis*.

7.6 DISEÑO DE PRIMERS

El diseño de primers para amplificar la región codificante de los genes *ldh* y *ackA* y *ppk*, se llevó a cabo tomando como base las secuencias nucleotídicas de *B. longum* reportadas en el GeneBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Cada secuencia se analizó con el programa *ORF finder* para localizar los marcos abiertos de lectura y por consiguiente, la región codificante de cada uno. Una vez localizados el inicio y el fin de cada gen, se eligieron 16 nucleótidos de cada región y se sintetizaron por la empresa Bioselect S.A. de C.V. En las figuras 12, 13 y 14 se muestran los datos obtenidos del GeneBank para cada secuencia y se indican enmarcados los nucleótidos que se utilizaron como base para sintetizar los primers para amplificar cada gen.

7.6.1 LACTATO DESHIDROGENASA (*ldh*)

(Genebank No. de acceso M33585).

ORIGIN

```
1 gtcgacgcbg tcaatgacgt gttggcggac atcgaaggca cggcctcga tccgcgtatt
61 ctcbgtattca acaaggccga tcaggcggac gaggcgaact gtgaacgaact cgcgcgcctg
121 cagccagatg cgttcacgtt ctccgcctat accggtgagg gattggacga gctgcbgtacc
181 gcbggtcgaaa gtctgctgcc ggtcccbgat gtgcbatgca acgctctgct gccgtatacc
241 gctggctccc tgatctctcg tgtacgcgaa tacggcaagg tagacaagg ggagtaccgc
301 gatgatggca tacagcttga agcggacgtt gatgccccat ttgcbgctcag gtggctcaac
361 agtccattga ctaacgtgat aaacatcaca gtatatctgt gagcbgtaac aaccgttgaa
421 aacattacca tacggttgtc aaacaggggt gtgtgcbggt agcaaaacgt cttagcbggt
481 ttatagagtg aagacgttag ttacaaggcc tgccattcat cagcbgaccg cctttgaaga
541 gaggttcatc catcatggcg gaaactaccg ttaagccca gaagcttgc gttattgggt
601 ccbgtgcbgt tggctccacc ctcbgcttcbg ccbgtgcbca gcbgtggcctc gctcbgcbga
661 tcbgtgcttga agacatcbgc aaggagcbgc tggaaagcbga agtgctcbg acgcbgcbgt
721 gctccagctt ctacccbgac gtgtccatcbg acbgttcbga cbgctcbgag atctcbgcbg
781 acgcbgcbat ggtcbgtcct acccbgtggtc cbgcbgcbgaa gcbgggcbg tctcbgtctg
841 agctcbgttg cbgtaccbgt aacatcbctc agbcbcbat gcbgaaccbg gtbcaagbtg
901 ctcbgaacgb catctacatg ctcbatcbca acccbgtcbg cbtcbgctacc ccbgtggctc
961 agaagctcac cbgtctgccc gagaaccbga tcttcbggtc cbgcbaccaac ctggactcbg
1021 ctcbgtcbgcb ctctcbgtat gcccbgcbga ccbgcbgcbca cbgtcaagaac gtbcbgcbgt
1081 acatcbgcbg cbgacacgbg gactcbgaag tcccbgctg tcccbgcbg accatcbggtg
1141 gcbgtcccbat gtgcbgactg acccbgcbgtc ccbgcbcbga tccgbgcbg ccbgcbgcbg
1201 gcbgagbgbat cbcbcbgga gtbcaagaac cbgcttcbca gatcbatcaac ggbtaagbgtg
1261 cbcbcbcbat cbgcbatcbg atgtcbgcbg tcbgcbatcb cbgaagcbgtc ctgcbgcbga
1321 cbcbcbcbat tctgcbcbgt agctcbatgb tcbcbagbct cbcbcbgcbt tccgcbatct
1381 gcbatgbtcbg gcbgaccbct ctcbcbcbgt agbgbcbtcb cbcbcbcbat aacacbbcbg
1441 tctcbgcbca gbagctcbgcb gctcbgcbgcb gctcbgcbga gcbgtgcbg gaaacbbcbg
1501 cbcbgttcbg cttctgataa aaaatcbgcbg tacbgbgcbg ctttcbgcbg gcbgcbgcbg
1561 tcbgcbcbat tttgtagbcb ttcacbtgtg gcbgcbcbga aatcbgcbcb gtbcbgcbat
1621 tttttcbatcb ctgbgtgatg ctcbcbgttg gcbgcbatctt tcttcbgtgga gttcbgttga
1681 gbagggggag ctatagcbct cbggcbgcbg cbggaagbtg gtbgtggggga ccbgacbbcbg
1741 gaagbtgcbg cbgcbgcbat cctgbgcb
```

Figura 12. Secuencia nucleotídica del gen *ldh* de *B. longum* donde se muestran enmarcados los nucleótidos utilizados como primers para amplificar por PCR la región codificante de 962 pb.

7.6.2 ACETATO KINASA (*ackA*)

(Genebank No. de acceso NC004307).

ORIGIN

```
1  atggcgaaaa cgcctctgt catcaattcc ggctccagct cgatcaagta ccagctggtt
61 gatctcgaat ccggcgaagg cctcgcttcc ggctcgtcgc agaagatcgg tgagccggtc
121 gacggccact acaagcacga gtacaacggc gaaaagcacg agcttgaaga gccgattcac
181 gaccacgagc agggctctgaa gcgcgtgctc ggcttcttcg aggagtacgg cccgaacctg
241 tctgaggctg gcattgtcgc cgtcggccac cgtgtgggtg aggggtggctc tatcttcccg
301 aagccggccc tcgtgaccaa caagaccatc aaccaggtea aggatctggc tgtgctcgcc
361 ccgctgcaca acggaccgga ggccaagggc gccgaagtca tgcgctccct gctgccggac
421 gttccgcaga tttcgtctt cgattcctcc ttcttcttcc agctgccgaa ggccgccagc
481 acctacgcgc tgaacaagga aatcgccgat cagtaccaca tccgccgcta cggcgccac
541 ggcacctccc acgagtacat ctctccgtg gtgccggacg tcatcggcaa gccggctgaa
601 ggcctgaagc agatcgtttt gcacatcggc aacggcgctt ccgcttccgc tgaggctctc
661 ggcaagccgg ttgagacctc catgggtctg accccgcttg agggcctgat gatgggccc
721 cgtaccggtg acatcgacce ggctgtggtc ttccacctga tccgcaacgc ccacatgaac
781 gtggacgagc ttgacgcctt gttcaacaag cgttccggca tgatgggcat gaccggctat
841 ggcgatttgc gtgaggttca ccgtctgggt tccgagggca atgaggacgc caagctggct
901 ctggatgtct acgtgcaccg catcgtcagc tacatcggca actacaccta ccagatgggt
961 ggctgcgacg tgatcacctt caccgctggc gtgggcgaga acgacgacgt ggtccgcaag
1021 atgggtgtgcg acaagctcgc tccgttcggc gtcaagctgg acgaggagaa gaacgccacc
1081 cgctccaagg aaccgcgcat catctccact ccgactcct ccgtgatcat cgcctgatt
1141 ccgacgaacg aagagctggc catcgccgc aagtccgccc caatcgccga agccggcacc
1201 gacacctacg gcaacacctt cgccaagtaa
```

Figura 13. Secuencia nucleotídica del gen *ackA* de *B. longum* muestran enmarcados los nucleótidos utilizados como primers para amplificar por PCR la región codificante de 1230 pb.

7.6.3 FOSFOCETOLASA (*ppk*)

(Genebank No. de acceso NC004307)

ORIGIN

```
1 atgacgagtc ctgtta ttgg cacccttgg aagaagctca acgctccggt ttccgaggaa
61 gccctcgaag gcggtgacaa gtactggcgc gttgccaaact acctttccat cggccagatt
121 tatctgcggt ccaaccgcgt gatgaaggag cccttcaccc gcgaagatgt gaagcaccgt
181 ctggtggggc actggggcac taccctggc ctgaacttcc tcatcggcca catcaaccgt
241 ttcattgctg accacggcca gaacaccgtg atcatcatgg gcccgggcca cggtgggccc
301 gccgtacct cccagtccta cctggacggc acctacaccg agaccttccc gaagatcacc
361 aaggacgaag ctggtctgca gaagtctctc cgtcagttct cttaccgggg cggcattccg
421 tcccacttcg ctccggagac cccgggctcc atccacgagg gtggtgagct gggttacgct
481 ctgtcccacg cttacggcgc catcatggac aacccgagcc tgtttgtccc ggccatcgct
541 ggcgacggcg aggctgagac cggcccgtg gctaccggct ggcagtcaa caagctcgctg
601 aaccgcgca ccgacgggat cgtgctgccg atcctgcacc tcaacggcta caagatcgcc
661 aaccgacca tcctgtcccg catctccgac gaagagctcc acgagttctt ccacggcatg
721 ggttacgagc cctacgagtt cgtcgtggc ttcgatgatg aggaccacat gtccatccac
781 cgtcgtctcg ccgagctgtg ggagaccatc tgggacgaga tctgcgacat caaggccacc
841 gtcagaccg acaacgtgca ccgtccgctt taccgatgc tgatcttccg caccocgaag
901 ggctggacct gccgaagta catcgacggc aagaagaccg agggctcctg gcgttcccac
961 caggtgccgc tggcttccgc ccgcgacacc gaggcccact tcgaggttct caagaactgg
1021 ctcgagtcc tacaagccgga agagctgctt gacgccaaac gtgctgtcaa ggacgacgct
1081 cttgccttca tgccgaaggg cgagctgctt atcggtgcca acccgaacgc caacggtggt
1141 gtgatccgca acgacctgaa gctgccgaac ctcgaggact acgaggtcaa ggaagtggct
1201 gagtacggcc acggctgggg ccagctcgag gccaccgta ccctgggtgc ctacatcgc
1261 gacatcatca agaacaacc gcgcgacttc cgcattctcg gaccgatga gaccgcttc
1321 aaccgtctgc aggcttccca cgaagtcacc aacaagcagt gggatgccgg ctacatctcc
1381 gacgaggtcg acgagcacat gcacgtctcc ggccaggctg ttgagcagct gtccgagcac
1441 cagatggaag gcttccctga ggcttacctg ctgaccggct gtacggcat ctggagctcc
1501 tacgagtcc tcgtccacgt gatcgactcc atgctgaacc agcacgcaa gtggcttgag
1561 gctaccgtcc gcgagattcc gtggcgcaag ccgattgctt ccatgaacct gctggtctcc
1621 tcccacgttt ggcgtcagga ccacaacggc ttctcccacc aggatccggg tgtcacctcc
1681 gtcctgctga acaagtgctt ccacaacgac cacgtcatcg gcattactt cgccaccgat
1741 gcgaacatgc tgctggccat cgcgagaag tgctacaagt ccaccaaaa gatcaacgcc
1801 atcatcgctg gtaagcagcc tgctgccacc tggctgacc tggacgaggc tcgtgccgag
1861 ctcgagaagg gtgccgcccg ttgggattgg gcttccaccg ccaagaaaa cgatgaggcc
1921 gaggtcgtgc ttgccgcccg cggcgatgct ccgactcagg agatcatggc tgcttccgac
1981 aagctgaagg aactgggcat caagttcaag gttgtgaacg ttgccgacct gctctccctg
2041 cagtcgcca aggagaacga cgaggctctg accgacgagg agttcgccga catcttacc
2101 gccgacaagc cgggtgctgt cgcgtaccac tctacgctc acgacgtgcg tggcctgatc
2161 tacgaccgtc cgaaccacga caacttcaac gtccacggct acgaggagga gggctccacc
2221 accacccgt acgacatggt tcgtgtcaac cgcacgacc gctacgagct gaccgtgag
2281 gctctgcgca tgatcgacgc cgacaagtac gccgacaaga tcgacgagct cgagaagttc
2341 cgtgatgagg ccttccagtt cgcgctcgac aacggctacg atcaccggga ctacaccgac
2401 tgggtgact ccggcgtgaa caccgacaag aagggtgccg tcaccgctac cgcgctacc
2461 gc tggcgaca acgagtga
```

Figura 14. Secuencia nucleotídica del gen *ppk* de *B. longum* donde muestran enmarcados los nucleótidos utilizados como primers para amplificar por PCR la región codificante de 2478 pb.

7.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los primers que se utilizaron para amplificar los genes *ldh*, *ackA* y *ppk* se muestran en la tabla 4. De cada uno de ellos se preparó una solución a una concentración de 20 pmol/μl. Se calculó la T_m para determinar la temperatura de alineamiento con el DNA molde en la reacción de PCR por medio de la siguiente ecuación:

$$T_m = \frac{(T_m1 + T_m2)}{2} - 4$$

Tabla 4. Primers utilizados para amplificar los genes *ldh*, *ackA* y *ppk*.

Primer	Secuencia	T_m	Gen a amplificar	Tamaño del gen
LDH1	5' ATGGCGGAAACTACCG3'	41°C	LACTATO DESHIDROGENASA	962 pb
LDH2	5' TCAGAAGCCGAACTGG3'		"	
ACK1	5' ATGGCGAAAACCGTCC3'	38°C	ACETATO KINASA	1230 pb
ACK2	5' TTA CTTGGCGAAGGTG3'		"	
PPK1	5' ATGACGAGTCCTGTTA3'	39°C	FOSFOCETOLASA	2478 pb
PPK2	5' TCACTCGTTGTCGCCA3'		"	

Para optimizar la amplificación de los genes, se utilizaron los DNA purificados de *B. infantis*, la T_m utilizada en el primer experimento fue de 38°C para los tres genes. A esta temperatura, al amplificar el gen *ldh*, se obtuvieron dos bandas una de ellas muy por

debajo del tamaño esperado. Para el gen *ackA*, se obtuvieron también dos bandas, una de ellas muy cerca del tamaño esperado de 1230 pb y la otra menor, de aproximadamente 750 pb. En cuanto al gen *ppk*, se esperaba amplificar una banda de 2478 pb, sin embargo se obtuvieron varias bandas inespecíficas, una de ellas, la más intensa arriba de 1000 pb, la banda de mayor tamaño se aproximó al tamaño esperado (2478 pb) (Fig. 15).

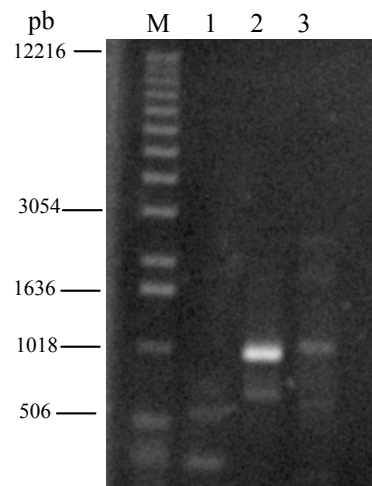


Figura 15. Gel de agarosa al 1%. Amplificación de los genes *ldh*, *ackA* y *ppk* utilizando una T_m de 38°C. Carriles: M-marcador 1 Kb, 1-*ldh*, 2-*ackA*, 3-*ppk*.

Las reacciones de PCR se optimizaron modificando la T_m hasta que se amplificaron cada uno de los genes *ldh* y *ackA*. El gen *ppk* no logró amplificarse de manera satisfactoria, lo cual puede deberse a que el contenido de G+C del genoma de las bifidobacterias es aproximadamente de un 60%, lo que ocasiona que al amplificar fragmentos de DNA tan grandes como el del gen *ppk* (2478 pb), la enzima polimerasa no logre terminar de añadir nucleótidos cuando las dos cadenas de DNA se comienzan a

unir nuevamente, lo que representa un impedimento físico para que se complete la etapa de extensión. Para superar esto se recomienda utilizar en trabajos posteriores, una enzima polimerasa diseñada para amplificar fragmentos de DNA grandes, o añadir algún reactivo como formamida o dimetil sulfóxido que ayuden a la desnaturalización del DNA y mantener las cadenas de éste separadas durante más tiempo.

Posteriormente los genes amplificados se purificaron cortando cada una de las bandas de los geles de agarosa, para lo cual se utilizó un kit de purificación como se describió en materiales y métodos (Fig. 16).

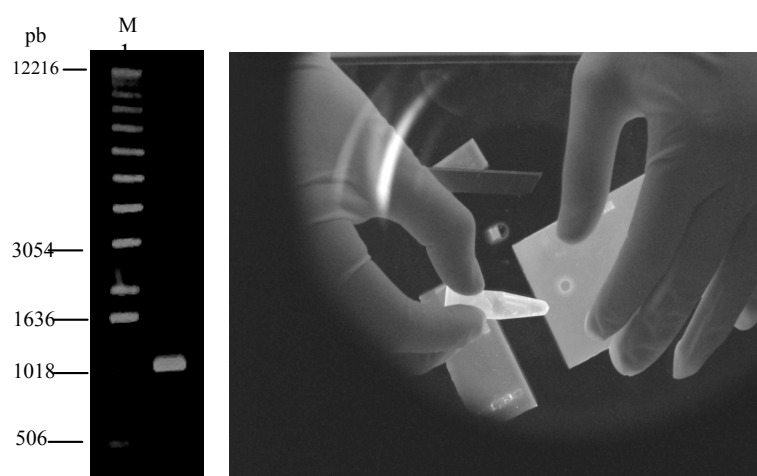


Figura 16. Proceso de purificación de los fragmentos de PCR.

Se cortó la banda del gel preparativo (*ackA*) y se procedió a purificar con el kit Qiaquick de Qiagen.

Los fragmentos de DNA correspondientes a los genes *ldh* y *ackA*, una vez amplificados y purificados (Fig. 17), se secuenciaron siguiendo el protocolo indicado en materiales y métodos.

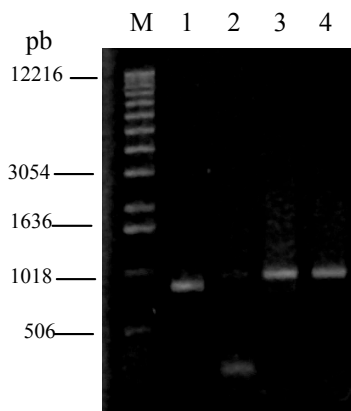


Figura 17. Gel de agarosa al 1%. Genes *ldh* y *ackA* purificados.
Carriles: M-marcador 1 Kb, 1-gen *ldh*, 3- gen *ackA*, 4- gen *ackA*.

Hasta el momento, se han obtenido los elementos necesarios para realizar un estudio de expresión de genes de *B. infantis* en diferentes condiciones de cultivo. Con el RNA y los fragmentos de DNA que corresponden a cada uno de los genes *ldh*, *ackA* y *ppk*, se realizará en trabajos posteriores, experimentos tipo Northern blot, lo cual involucra efectuar electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes y libres de RNAsas, transferir los RNA a una membrana y ésta hibridarla con los fragmentos de PCR, previamente marcados con un compuesto radiactivo o fluorescente. Esto permitirá que los fragmentos de DNA hibriden con su correspondientes RNA por apareamiento de bases. Con esto se conocerá en que momento de las fases del crecimiento de *B. infantis* está ocurriendo una síntesis de los transcritos o lo que hemos llamado la expresión de los correspondientes genes.

Las enzimas lactato deshidrogenasa y acetato kinasa que son codificadas por los genes *ldh* y *ackA* respectivamente, tienen como sustrato el piruvato, éstas forman lactato y acetato como productos finales del metabolismo de bifidobacterias. En varios trabajos, se ha reportado que estos compuestos junto con otros ácidos grasos de cadena corta, están directamente involucrados con los efectos benéficos de las bifidobacterias en el

huésped. Estos compuestos pueden también ser intermediarios en el proceso global de fermentación de la microflora y son utilizados por otras especies microbianas del ecosistema y no son necesariamente acumulados ni utilizados en el intestino por el huésped (Bernalier y col., 1999).

La formación de estos ácidos grasos de cadena corta por las bacterias del intestino humano, es regulada por factores ambientales, microbiológicos y propios de la dieta. Sin embargo, la disponibilidad del sustrato, el tipo de especies bacterianas presentes en la flora y el tiempo del tránsito gastrointestinal, determinan las cantidades y el tipo de ácidos grasos de cadena corta que se producen en los individuos. La producción de la mayoría de este tipo de ácidos grasos deriva de la degradación de carbohidratos complejos además de que el metabolismo del hidrógeno en bacterias afecta la forma en que estos ácidos grasos de cadena corta son formados, esto se ha visto por los efectos de los aceptores inorgánicos de electrones como el nitrato y el sulfato en los procesos de fermentación los cuales permiten la formación de compuestos más oxidados como el acetato y no de ácidos grasos más reducidos como el butirato (MacFarlane y MacFarlane, 2003).

En estudios realizados en cultivos puros de bacterias del tracto gastrointestinal, se ha demostrado que la disponibilidad de la fuente de carbono y la velocidad de crecimiento afectan directamente el curso de la fermentación. El acetato y formato son los principales productos de fermentación de bifidobacterias bajo condiciones limitadas de fuentes de carbono, mientras que el acetato y el lactato son producidos cuando el sustrato está en exceso (MacFarlane y MacFarlane, 2003).

La falta de herramientas genéticas y la diversidad de los estudios realizados de manera aislada han impedido el desarrollo y la comprensión de los mecanismos moleculares de bifidobacterias. El único genoma de bifidobacterias que se ha secuenciado completamente hasta el momento es el de *B. longum* (Schell y col., 2002), el cual por análisis informáticos, se sabe que consta de 1730 genes que codifican para proteínas. Esta información puede dar indicios del comportamiento de esta especie en función de

su ambiente en el tracto gastrointestinal y de sus interacciones con el huésped. Con el análisis de secuencias, Schell y colaboradores (2002), reportan que *B. longum* tiene un excesivo número de genes involucrados con el metabolismo de carbohidratos (aproximadamente 8% del genoma). Estos datos representan 30% más de los que contienen otros microorganismos como *E. coli*, *L. lactis*, y *B. subtilis*, entre otros.

8. CONCLUSIONES

- ✓ El crecimiento de *B. infantis* se ve favorecido al utilizar lactosa y sacarosa como fuentes de carbono, sin embargo, se obtiene menor crecimiento al utilizar glucosa.
- ✓ *B. infantis* utilizó toda la lactosa presente en el medio de cultivo, no así los otros tres sustratos (glucosa, inulina y sacarosa).
- ✓ Valores de pH cercanos a 5.0 inhiben el crecimiento de *B. infantis*.
- ✓ Se extrajo y purificó RNA de cada una de las cinéticas de fermentación de *B. infantis* en las tres fases de su crecimiento.
- ✓ Se optimizaron las condiciones de PCR para amplificar los genes *ldh* y *ackA* de *B. infantis*.

9. PERSPECTIVAS

- Optimizar la amplificación del gen *ppk*.
- Clonar los genes *ldh*, *ackA* aislados en el presente trabajo.
- Llevar a cabo el análisis de la expresión de genes *ldh*, *ackA* y *ppk* en cada una de las fases del crecimiento de *B. infantis* en diferentes sustratos.
- Monitorear la formación de lactato y acetato durante el crecimiento de *B. infantis* por cromatografía (HPLC o TLC).
- Analizar por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) el patrón de expresión de proteínas en cada cinética de crecimiento.
- Determinar las actividades de las enzimas lactato deshidrogenasa, acetato kinasa y fosfoacetolasa para correlacionarlos con los datos de expresión de los genes respectivos.
- Determinar la actividad de algunas enzimas clave del metabolismo de azúcares de *B. infantis* como β -galactosidasa o inulinasa al crecer en diferentes oligosacáridos.

10. REFERENCIAS

- Abdelali H., Cassand P., Soussotte B., Koch-Bocabeille B. and Narbonne J.F. (1995). Antimutagenicity of components of dairy products. *Mutation Res.* 331: 133 - 141.
- Ahn J.B., Hwang H.J. and Park J.H. (2001). Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11:443–451.
- Azaola A., Bustamante P., Saucedo G., González R., Ramos C. and Saval S. (1999). Use of surface response methodology to describe biomass production of *Bifidobacterium infantis* in complex medium. *Biotechnology Techniques* 13:93-95.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S. and Bottazzi V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol. Enzim.* 50:117-131.
- Ballongue J., (1998). Bifidobacteria and probiotic action p. 519–587. *In* S. Salminen and A. von Wright (ed.), *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Bernalier A., Dore J. and Durand M. (1999). Biochemistry of fermentation. In *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*, pp. 37–53 [GR Gibson and MB Roberfroid, editors]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Bucke C. and Rastall R.A. (1990). Synthesising sugars by enzymes in reverse. *Chemistry Britain.* 26:675-678.
- Cagigas R.A., y Blanco A.J. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Rev. Cub. Aliment. Nut.* 16(1):63-8.
- Carlsson, J., Nyberg G. and Wrethen J. (1978). Hydrogen peroxide and superoxide radical formation in anaerobic broth media exposed to atmospheric oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:223–229.

-
- Cassand P., Abdelali H., Bouley C., Denariaz G. and Narbonne J.F. (1994). Inhibitory effect of dairy products on the mutagenicities of chemicals and dietary mutagens. *J. Dairy Res.* 61:545-552.
 - Collins M. and Gibson R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (suppl):1052–1057.
 - Cummings J.H. and Macfarlane G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin. Nutr.* 16:3-11.
 - Cummings J.H. (1998). Dietary carbohydrates and the colonic microflora. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 1:409-414.
 - Davidson M.H., Synecki C., Maki K.C. and Drenman K.B. (1998). Effects of dietary inulin in serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 3:503-517.
 - Degnan B.A. and Macfarlane G.T. (1991). Comparison of carbohydrate substrate preferences in bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 68:151-156.
 - Desjardins M., Roy D. and Toupin C. (1990). Uncoupling of Growth and Acids Production in *Bifidobacterium* ssp. *J. Dairy Sci.* 73:1478-1484
 - De Smet. (1994). In vitro studies of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity *Microbial Ecology in Health and Disease.* 7:315-329.
 - De Vuyst L. (2000). Technology Aspects Related to the Application of functional Starter Cultures. *Food Technol. Biotechnol.* 38(2):105–112.
 - Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X. and Ling D. (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* spp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:119–125.
 - Duffy L.C., Zielezny M.A. and Riepenhoff-Talty M., (1994a). Reduction of virus shedding by *B. bifidum* in experimentally induced MRV infection. *Dig. Dis. Sci.* 39:2334–40.
 - Duffy L.C., Zielezny M.A. and Riepenhoff-Talty M. (1994b). Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatr. Res.* 35:690–695.
 - Dubois M., Gilles K., Hamilton K., Roberts P. and Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3):350-356.

-
- Ebissawa E., Assari T., Takeda S., Watanbe A., Nehei K., Tamashita T., Wakiguchi H. et Watanbe S. (1987). Utilization de lait fermenté additionné de *Bifidus actif* chez la femme enceinte, premier colloque. B.L. et santé. Monte Carlo. Médecin et chirurgie. Digestive. 16:9-11.
 - Ellegård L., Andersson H. and Bosaeus I. (1997). Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe or bileacids but increases energy excretion in ileostomy subjects. European J. Clin. Nutr. 51:1-5.
 - Falony G., Vlachou A., Verbrugghe K. and De Vuyst L. (2006). Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. Appl. Environ. Microbiol. 72(12):7835–7841.
 - Farmworth E.R. (2001). Probiotics and prebiotics. Wildhman REC (ed.): Handbook of Nutraceuticals and Funtional Foods. Crc. Press. LLC. Florida 407-418.
 - Fasoli S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F. and Torriani S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. Int. J. Food Microb. 82(1):59-70.
 - Favier C., De Vos W. and Akkermans A. (2003). Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. Anaerobe 9(5):219-229.
 - Fujiwara S., Hashiba H., Hirota T. and Forstner J.F. (1997). Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. Appl. Environ. Microbiol. 63:506-512.
 - Fuller R. (1989). Probiotics in man and animal. J. Appl. Bacter. 66:365-78.
 - Gibson G. R., Beatty E. B., Wang X., and Cummings J. H. (1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterol. 108:975.
 - Gibson G. R. and Roberfroid M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the Torres R. concept of prebiotics J. Nutr. 125:1401-1412.
 - Gibson G. R., Willems A., Reading S. and Collins M. D. (1996) Proc. Nutr. Soc. 55:899-912.
 - Gibson G.R., Rastall R.A. and Roberfroid M.B. (1999). Prebiotics. In: Colonic Microbiota: Nutrition and healt. G.R. Gibson and M.B. Roberfroid (Eds). Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 101-124.

-
- Gibson G.R., Probert H.M., van Loo J.A.E., Rastall R.A. and Roberfroid M.B. (2004). Dietary Modulation of the human colonic microbiota: Uptating the concept of prebiotics. *Nutr. Research Rev.* 17:259-275.
 - Gibson G. R. and Rastall R. A. (2006). *Prebiotics. Development & Application.* John Wiley & Sons Ltd. England.
 - Gilliland S. E., Nelson C. R. and Maxwell C. (1985). Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(2):377–381.
 - Gionchetti P., Rizzellom F., Venturi A. and Campieri A. (2000). Probiotics in infective diarrhea and inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol Hepatol.* 15: 489–493.
 - Goldin B.R., Gorbach S.L., Saxelin M., Barakat S., Gualtiere L. and Salminen S. (1993). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digest. Disea. Sci.* 37:121–8.
 - Gomes A.M.P. and Malcata F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* 10:139–157.
 - Grill J-P, Crociani J and Ballongue J (1995). Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. *Letters Appl. Microbiol.* 20:328-330.
 - Heller S., Solórzano F., Pérez R., Blasto y González J.M. y Vargas F. (2001). Probióticos. Una alternativa eficaz en el tratamiento de la diarrea y otros trastornos en el tubo digestivo. Byk Gulden. México.
 - Hillman K., (1999). En: Proc. WPSA Spring Meeting, Scarborough. Pp 59-61.
 - Jack R.W., Tagg J.R. and Ray B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171–200.
 - Klein G., Pack A., Bonaparte C. and Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41:103–125.
 - Lê M.G., Moulton L.H., Hill C. and Kramar A. (1986). Consumption of dairy produce and alcohol in a casecontrol study of breast cancer. *J. Nation. Cancer Inst.* 77:633-636.
 - Leahy S., Higgins D., Fitzgerald G. and Sinderen D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *J. App. Microbiol.* 98:1303-1315.
 - Lilly D.M. and Stillwell R.H. (1965). Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147:747-748.

-
- Ling W.H., Korpela R., Mykkanen H., Salminen S. and Hanninen O. (1994). *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr.* 24:18–23.
 - MacConaill L., Butler D., O’Connell-Motherway., Fitzgerald G. and Sinderen D. (2003). Identification of Two-Component Regulatory Systems in *Bifidobacterium infantis* by Functional Complementation and Degenerate PCR Approaches. *App. Environ. Microbiol.* 69(7):4219–4226.
 - MacFarlane S. and MacFarlane G. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society.* 62:67–72.
 - Mahida Y.R. and Rolfe V.E. (2004). Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease. *Clin. Sci.* 107:331–341.
 - Matsumoto M., Ohishi H. and Benno Y. (2004). ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* 93:109–113.
 - Marteau P., Minekus M. and Havenaar R., (1997). Huis in’t Veld JHJ. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy. Sci.* 80:1031-7
 - Maté J. (1996). *Fibra dietética en medicina: Actualización temática en Gastroenterología.* Barcelona. Jarpuyo Editores y Laboratorios Madaus.
 - Metchnikoff E. (1907). In *The prolongation of life: optimistic studies*, ed. Chalmers Mitchell. London : William Heinemann.
 - Midolo P.D., Lambert J.R., Hull R., Luo F. and Grayson M.L. (1995). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 79:475-479.
 - Ming N., Zhicheng X., Nien H., Tai, Byongh L. (2001). Molecular and Biochemical Analysis of Two-Galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(9):4256- 4263.
 - Minowa T., Iwata S., Sakai H., Masaka H. and Ohta T. (1989). Sequence and characteristics of the *Bifidobacterium longum* gene encoding-lactate dehydrogenase and the primary structure of the enzyme: a new feature of the allosteric site. *Gene* 85(2):161-168
 - Mitsuoka T. (1982). A methods for investigation of intestinal microflora. In: Ueno K (ed.) *Procedures for Isolation and Identification of Anaerobic Bacteria*, pp. 64–116. Saikon Press, Tokyo.

-
- Morisse J.P., Maurice R., Boilletot E. and Cotte J.P. (1993). Assessment of the activity of a fruto-oligosaccharide on different caecal parameters in rabbits experimentally infected with *E. coli* 0.103. *Annals of zootechnology*. 42:81-87.
 - Nilsson U., Oste R., Jagerstad M. and Birkhed D. (1988). Cereal fructans: in vitro and in vivo studies on availability in rats and humans. *J. Nutr.* 118:1325-1330.
 - Nunoura N., Ohdan K., Yamamoto K. and Kumagai H. (1997). Expression of the β -glucosidase I gene in *Bifidobacterium breve* 203 during acclimation to cellobiose. *J. Ferment. Bioeng.* 83(4):309-314.
 - Oku T., Tokunaga T. and Hosoya N. (1984). Nondigestibility of a new sweetener, "Neosugar" in the rat. *J. Nutr.* 114:1574-1581.
 - Orla-Jensen S. (1984). La classification des bactéries lactiques. *Lait* 4:468-474.
 - Orrhage K., Sillerström E., Gustafsson J. A., Nord C.E. & Rafter J (1994). Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutation Res.* 311:239-248.
 - Ouwehand A.C. and Vesterlund S. (2003). Health Aspects of Probiotics. *Drugs*; 6:573-580.
 - Pardio V.T., Krzysatof N., Waliszewski K.N. y Robledo G. (1994). Los probióticos y su futuro. *Arch. Latinoam. Nutr.* (4681):6-10.
 - Penna F.J. (1998). Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. *Rev. Enfer. Infec. Ped.* XI (6):182.
 - Perdigón G., Alvarez S., Rachid M., Agüero G. and Gobbato N. (1995). Immune stimulation by probiotics, *J. Dairy Sci.* 78:1597-1606
 - Redondo L. (1999). La fibra terapéutica. Barcelona. Laboratorios Madaus: 27-40.
 - Reid C. A. and Hillman K. (1999). *Animal Science*. 68:503-510.
 - Reuter G. (1963). Vergleichende untersuchungen über die bifidus-flora im säuglings und erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.*, 191:486-507.
 - Reyed M.R. (2007). The Role of Bifidobacteria in Health. *Research J. Med.and Med. Sci.* 2(1):14-24.
 - Rojas E. (1994). La fibra dietética. En: Rojas Hidalgo E. (ed). *Los carbohidratos en nutrición humana*. Madrid: Grupo Aula Médica. 119-138.

-
- Roberfroid M.B., Bonet F., Bouley C. and Cumming J.H. (1995). Colonic microflora: Nutrition and health. *Nutr. Rev.* 53:127-30.
 - Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni S., y Matteuzzi D. (2005) Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6150-6158.
 - Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A. and Yolken R.H. (1994). Feeding of *Bifidoacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 344: 1046-1049.
 - Sako T., Matsumoto K. and Tanaka R. (1999). resend progress on research and applications of nondigestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 9:69-80.
 - Salminen S. and von Wriugh A. (1998). Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. 2nd edition Marcel Deker Inc. N.Y. USA.
 - Sanders, M.E. (1999). Probiotics-Scientific-status summary. *Food Technol.* 53:67-77.
 - Savory C. J. (1992). Enzyme supplementation, degradation and metabolism of three U-14C-labelled cell-wall substrates in the fowl. *Br. J. Nutr.* 67:91-102.
 - Scardovi V. and Orla-Jensen. (1986). Genus Bifidobacterium In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp. 1418–1434. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
 - Schell M.A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M.-C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore D. and Arigoni F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:14422-14427.
 - Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschmann J.M. and Donnet-Hughes. (1995). A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 78:491-497.
 - Shah N. (2001). Functional Foods from Probiotics and Prebiotics, *Food Tecnol.* 11:46-53.
 - Shanahan F. (2002). Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future. *Br. J. Nutr.* 88:S5–S9.
 - Shimamura S., Abe F., Ishibashi N., Miyakawa H., Yaeshima T.A. and Tomita M. (1992). Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.* 75:3296– 3306.

-
- Shin H.J., Park J.M. and Yang J.W. (1998). Continuous Production of Galacto oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process biochem.* 33:787-792.
 - Simpson P.J., Ross R.P., Fitzgerald G.F. and Stanton C. (2004). *Bifidobacterium psychraerophilum* spp. nov and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 401–406.
 - Stiles M.E. and Holzappel W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.
 - Tannock G.W. (1999). Probiotics: A critical review. G.W. Tannock, ed Orizon Scientific Press. Wymondham. p. 5-14.
 - Teak-Bum K., Su-Han S., Su-Cheol K. and Deok-Kun O. (2003). Quantitative Comparison of Lactose and Glucose Utilization in *Bifidobacterium longum* Cultures. *Biotechnol. Prog.* 19:672-675.
 - Titgemeyer E.C., Bourquin L.D., Fahey G.C. and Garleb K.A. (1991). Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria in vitro. *Am. J. Clin. Nutri.* 5:1418-1424.
 - Tissier H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique). Thesis, ed. Georges Carre' et C. Maud, University of Paris. Paris, France, pp. 253.
 - Trindade M., Abratt V. and Reid S. (2003). Induction of sucrose utilization genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69(1):24–32.
 - Trowell H.C., Southgate D.A.T. and Wolvwe T.M.S. (1976). Dietary fiber redefined. *Lancet.* 1:1967-8.
 - Van der Meulen, R., T. Adriany, K. Verbrugghe and L. De Vuyst. 2006. Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD through its growth-associated production. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5204–5210.
 - Van't Veer P., Dekker J., Lamers J., Kok F., Schouten E., Brants H., Sturmans F. and Hermus R. (1989). Consumption of fermented milk products and breast cancer: A case-control study in the Netherlands. *Cancer Res.* 49:4020-4023.
 - Vázquez C. (2005). Purificación del DNA genómico y amplificación de la región V6-V8 del 16S rRNA por PCR de un consorcio microbiano localizado en heces fecales de infantes y bifidobacterias de colección. Tesis de Licenciatura. UAM-Xochimilco.

-
- Vázquez M.J., Alonso J.L., Domínguez H. y Parajo J.C. (2000). Xilo-oligosacaridos: Manufacture and applications. *Trends Food Sci. Technol.* 11:387-393
 - Ventura M., van Sinderen D., Fitzgerald G.F. and Zink, R. (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:205–223.
 - Wang R., Kim S., Robertson L. and Cerniglia C. (2002). Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol. Cell. Probes.* 16(5):341-350.
 - Wagner D.D. and Thomas O. P. (1987). Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chicks. *Poult. Sci.* 57:971-975.
 - Wanitschke R., Goerg K.J. and Loew D. (2003). Differential therapy of constipation A review. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 41:14–21.
 - Yun J.W., Lee M.G. and Song S.K. (1994). Continuous production of isomalto-oligosacaridos from maltose syrup by immobilized cells of permeabilized *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett.* 16:1145-1150.