

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
FUCOSIDASAS POR BIFIDOBACTERIAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

I. B. I. OMAR RODRÍGUEZ NAVA

ASESORAS: DRA. GABRIELA M. RODRÍGUEZ SERRANO

DRA. RINA M. GONZÁLEZ CERVANTES

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013.

México, DF a 30 de Agosto del 2013.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biologicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis

Evaluación de la producción de fucosidasas por bifidobacterias

Que presentó

I.B.I. Omar Rodríguez Nava

Asesores y firmas:

Directora: Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano

Asesora: Dra. Rina M. González Cervantes

Lectora: Dra. Deni Nava Arenas



The image shows three handwritten signatures on horizontal lines. The first signature is 'Gabriela M. Rodríguez Serrano', the second is 'Rina M. González Cervantes', and the third is 'Deni Nava Arenas'. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

AGRADECIMIENTO

A L arquitecto del universo (G.A.D.U), (colosenses 3:15) a aquél que es que era y que ha de ser, al león de la tribu de Judá, al lirio de los valles, a la rosa de Sharon, a la Alef y la tao, al Kadosh, alElohim, al Shadday, al Elyon, al príncipe de paz, a YeshúaHamashiahj, al RuachhaKodesh, al artífice de mis días, al que me sacó de la nada, a mi Abba a mi papito del cielo pues hoy entiendo a qué me envió a este sitio, he cumplido mi parte en este sitio hoy entiendo muchas cosas Abba, tú que eres el dueño del tiempo sabes si aún es tiempo para cumplir mi misión, no Abba no medigas que no pues laceraras mi corazón cual daga no me digas no, antes bien dime que aún es tiempo para hacer lo que tengo que hacer, Abba te amo más que mi vida, gracias por todo, hoy empiezo a ver tu respuesta a mis preces, pero no me digas no; yo no te puedo fallar dame tiempo y permite que en algunos lustros pueda yo estar cumpliendo mi misión Abba he llegado hasta hoy gracias a ti por ahora no puedo continuar con la siguiente fase, pero todavía no desisto ya estoy encauzado y no hay vuelta atrás, sin embargo necesito tu respaldo derrumba los valladares y los obstáculos que me puedan obstruir el camino; sé que la cúspide de la montaña está lejos, que la montaña es empinada y escarpada, pero tómame de tu mano para llegar al pináculo (Heme aquí envíame a mí) no quiero llegar delante de ti derrotado, abatido lo que te pido es nada para ti no me digas no, ayúdame Abba, pues el señor es mi pastor y nada me falta tu vara y tu cayado infunden mi aliento (Tehilim 23). Tú el omnipotente, omnisapiente, omnisciente, omnificiente, omnipresente, ubicuo, omnímodo, tú el que tiene presciencia, el ingenito y eterno tú el demiurgo espero tus directrices sé que tienes el tiempo y el espacio en tus manos y que aunque nuestra vida y destino te pertenecen nos has dado albedrío para estar en la libertad o en la cautividad. ¿Acaso me sacaste del Hades y del Seol para no cumplir mi cometido? escúchame que te hablo no me desampares esto recién inicia antes esto tiembla mi corazón y salta fuera de su sitio, empero si tú me respaldas yo lo haré, yo cumpliré infúndeme sabiduría de manera infusa y no me desampares por esta etapa te agradezco, por el siguiente regalo te bendigo, sin

embargo tu sacas de los muladares al mendigo y lo haces sentar entre reyes hágase en mi según tu palabra.

DEDICACIÓN

Quiero agradecer a la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano por su apoyo incondicional y por haber creído siempre en mis posibilidades, también quiero agradecerle por ayudarme, guiarme, aconsejarme e incentivar me en el estudio y en el trabajo, aunque hubo momentos difíciles espero no haberle fallado, siempre le recordare, le aprecio sobremanera. No puedo olvidarme de la Dra. Alma y de la maestra Lorena gracias por sus consejos y correcciones en mis exposiciones fueron muy útiles, gracias por todo. También quiero agradecer a mis compañeros y amigos de la planta piloto 2 por su gran amistad, cariño y paciencia a mi gran amiga del alma Deni te quiero muchísimo amiga gracias por ser el ser humano tan bello que eres, a Claudia por ser tan linda conmigo por alentarme a continuar, además eres la niña más hermosa del universo, a mi amiga Nayeli por ser tan linda y tan intensa, a mi amiga Angélica gracias por tu amistad y consejos. Gracias a todos los que de manera directa e indirecta me apoyaron a Oscar Malagón, a Alicia, a Yola, a Verence por brindarme su amistad, a Alizul y también a Anita gracias a todos, todavía no estoy finado regreso el próximo año pero bajo otras condiciones que espero sean más favorables, en la etapa postrera de mi estancia aquí he encontrado a alguien muy especial espero sea muy trascendente en mi vida y en mi futuro, quiero agradecer a aquellos que han compartido mis logros y mis desaciertos al ser más hermoso que me regalo Dios en la tierra (mi madre) gracias mami por todo tu apoyo, por todo lo que me has enseñado y me sigues enseñando; mamita tu y yo hemos pasado momentos durísimos desde la muerte de papa y vi como sufriste, pero seguimos de pie como él hubiera querido te amo per saecula saeculorum y a mi papi (que ya está en el cielo) gracias papi por hacer de mi lo que soy, por hacerme un hombre de bien, aunque a veces fuiste duro con nosotros hoy entiendo que fue en beneficio de mis hermanos y el mío espero cumplir con mi cometido ayúdame desde el sitio en que te encuentres para cumplir con lo que mi Abba me encomendó, a mis hermanos Nancy y Oscar y a mis sobrinitos que (son como mis hijos) con todo mi amor y cariño para Itzel, Alejandro, Dilan y Mayte.

Omar Rodríguez Nava.

México DF, Agosto 2013

**“ES DE LA IGNORANCIA Y TAN SÓLO DE LA
IGNORANCIA DE LO QUE EL HOMBRE DEBE SER
LIBERADO”**

ADAGIO ROSACRUZ

Índice general

Índice general.....	i
Índice de Tablas	iv
Índice de figuras.....	v
Resumen.....	vi
Abstract	vii
1. Introducción	1
2. Bifidobacterias	2
2.1. Historia de las Bifidobacterias.....	2
2.2. Morfología del género <i>Bifidobacterium</i>	3
2.3. Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i>	4
2.4. Hábitats.....	6
2.5. Fisiología	7
2.6. Características bioquímicas y metabolismo de las hexosas.....	8
2.7. Estructura celular	8
2.8. Requerimientos nutricionales.....	9
2.9. Medios de cultivo para el crecimiento de las bifidobacterias.....	9
3. Probióticos	10
3.1. Mecanismos de acción de los probioticos (bifidobacterias) para proteger al ser humano ..	13
4. Oligosacáridos de leche humana (OSLH)	15
4.1. Oligosacáridos de leche humana y bifidobacterias	16
5. Fucosidasas	17
5.1. Clasificación y mecanimos de reacción	17
5.2. Las Fucosidasas en el género <i>Bifidobacterium</i>	18

EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE FUCOSIDASAS POR BIFIDOBACTERIAS

5.3. Absorción de carbohidratos e inducción de enzimas en el género <i>Bifidobacterium</i>	19
6. Justificación	21
7. Hipótesis	22
8. Objetivos.....	22
8.1. General	22
8.2. Particulares	22
9. Desarrollo experimental	23
10. Materiales y Métodos.....	26
10.1. Microorganismos.....	26
10.2. Medios de cultivo.	26
10.3. Preparación del Stock	28
10.4. Determinación de curva de crecimiento.....	28
10.5. Ensayo para la determinación de la actividad enzimática	28
10.6. Determinación de la actividad extracelular	29
10.7. Determinación de la actividad enzimática intracelular por ruptura mecánica.	29
10.8. Determinación de la actividad enzimática en células completas.	30
11. Resultados y Discusión.....	31
11.1. Determinación de la actividad enzimática extracelular en medio Kabel.....	31
11.2. Determinación de la actividad enzimática extracelular en medio MRS	33
11.3. Determinación de la actividad enzimática intracelular en <i>B. infantis</i> por ruptura mecánica en medio MRS	33
11.4. Determinación de la actividad enzimática intracelular con la célula completa en medio MRS.	34
11.5. Crecimiento en medio con glucosa como fuente de carbono	35
12. Conclusiones	37
13. Bibliografía	38

EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE FUCOSIDASAS POR BIFIDOBACTERIAS

14. Anexo.....	46
14.1. Actividad enzimática extracelular e intracelular de las bifidobacterias.	46
14.2. Curva patrón de 4.Nitrofenol	48

Índice de Tablas

Tabla 1. Cronología del descubrimiento del género <i>Bifidobacterium</i>	3
Tabla 2. Porcentaje molar de G + C en bacterias ácidolácticas y <i>Bifidobacterium</i>	5
Tabla 3. Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i>	5
Tabla 4. Lista de especies pertenecientes al género <i>Bifidobacterium</i>	6
Tabla 5. Lista de especies del género <i>Bifidobacterium</i> presentes en base a su origen	7
Tabla 6. Medios no selectivos empleados para el cultivo de bifidobacterias	10
Tabla 7. Medios de cultivo selectivos empleados para el cultivo de bifidobacterias	12
Tabla 8. Bifidobacterias y otros probióticos que presentan mecanismos acción y de protección al ser humano	14
Tabla 9. Estudios del genoma del género <i>Bifidobacterium</i> que demostraron zonas que codifican para fucosidasas.	18
Tabla 10. Fucosidasas clonadas del género <i>Bifidobacterium</i>	19
Tabla 11. Composición del medio de cultivo MRS.	26
Tabla 12. Composición del medio de cultivo TPY.	27
Tabla 13. Composición del medio de cultivo Kabel.	27
Tabla 14. Actividad enzimática de la fermentación de <i>Bifidobacterium breve</i> sobre diferentes sustratos.	31
Tabla 15. Actividad enzimática en la fermentación de <i>Bifidobacterium lactis</i> sobre diferentes sustratos.	32
Tabla 16. Actividad enzimática en la fermentación de <i>Bifidobacterium longum</i> sobre diferentes sustratos.	32
Tabla 17. Actividad enzimática extracelular de las diferentes cepas de bifidobacterias evaluadas. .	33
Tabla 18. Actividad enzimática y específica de <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> 17930, <i>B. infantis</i> 14431 y <i>B. bifidus</i>	34

Índice de figuras

Figura 1. <i>Bifidobacterium longum</i>	4
Figura 2. Cambio de la flora intestinal en las diversas etapas de la vida.	13
Figura 3. Composición estructural de los oligosacáridos de leche humana que pueden ser agrupados en trisacáridos de cadena corta (Sialil-lactosa y Fucosil-lactosa) y oligosacáridos complejos	15
Figura 4. Pares de bases (Kb) que codifican glicosil-hidrolasas requeridos para metabolizar oligosacáridos de leche humana	16
Figura 5. Mecanismo de degradación de la molécula de arabino-xilano por <i>Bifidobacterium longum</i>	19
Figura 6. Mecanismo de actuación de la α -amilasa para la degradación de almidón	20
Figura 7. Hidrólisis de PNP-fucosido por medio de la fucosidasa.	29
Figura 8. Curva de crecimiento (C.C.) y evolución del pH de <i>B. infantis</i> 17930, <i>B. infantis</i> 14431, <i>B. longum</i> y <i>B. bifidus</i> en MRS.	36
Figura 9. Curva de crecimiento (C.C.) y evolución de <i>B. lactis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. breve</i> y <i>B. adolescentis</i> en MRS.	36

Resumen

El presente trabajo se enfoca en el estudio de las bifidobacterias capaces de producir fucosidasas con potencial para utilizarse en la síntesis de oligosacáridos semejantes a los encontrados en la leche humana. Las glicosil-hidrolasas, son enzimas capaces de sintetizar oligosacáridos con acción prebiótica. Entre estas enzimas, las fucosidasas son de especial interés debido a que pueden ser capaces de sintetizar oligosacáridos similares a los de la leche humana con importantes funciones biológicas como la inhibición de la adhesión de toxinas y patógenos al tracto gastrointestinal así como la promoción del crecimiento de bifidobacterias colónicas. Tales enzimas no se encuentran disponibles comercialmente, por ello, en el presente trabajo se evaluó la producción de fucosidasas de diversas cepas de bifidobacterias utilizando glucosa como fuentes de carbono: *Bifidobacterium infantis* 14431, *B. infantis* 17930, *B. longum*, *B. bifidus*, *B. animalis*, *B. lactis*, *B. breve* y *B. adolescentis*. Los microorganismos se propagaron en medio TPY y se inocularon en medio MRS-cisteína para la evaluación de la producción de fucosidasas. Se realizaron fermentaciones de 12 h tanto para su crecimiento como para su propagación a fin de tener al microorganismo en fase exponencial. El ensayo de actividad enzimática se llevó a cabo espectrofotométricamente, para ello se empleó como sustrato el para-nitrofenil-fucósido y se registró el incremento de la absorbancia con respecto al tiempo, se calculó la actividad enzimática de las cepas evaluadas. Las que presentaron actividad de α -L-fucosida fueron: *Bifidobacterium infantis* 17930, *B. infantis* 14461, *B. longum* y *B. bifidus*, por otro lado, las cepas que no presentaron actividad enzimática fueron: *Bifidobacterium lactis*, *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. breve*. Es deseable evaluar en un futuro la producción de fucosidasas en medios con diferentes fuentes de carbono y en particular en presencia de mucina además de proponer un método eficiente para la recuperación de la enzima intracelular.

Abstract

For some time scientists realized the great contributions and health benefits of microorganisms classified as probiotics, so these have become important and increasingly more products are included for the benefits they bring to the health of human. Among the microorganisms classified as probiotics *Bifidobacterium* genus find the microorganism which are more abundant in the newborn, these inhabit the intestine of humans in its infant stage because it can be developed from the oligosaccharides present in human breast milk, bringing great benefit to the host, such as: the reduction of pathogenic microorganisms in the digestive tract, the production of organic acids, reduces the duration of infectious diarrhea, microbiota balance, among others. Breast milk contains more than 130 different oligosaccharides, which constitute the third component thereof. Most abundant oligosaccharides in human milk are free (not conjugated) and neutral and also containing fucose. The fraction of undigested oligosaccharides in human breast milk stimulates the growth of bifidobacteria in the colon. This flora has beneficial effects and protection against enteric infections, so the fucooligosaccharides are an essential part of the innate immune system which protects against pathogens mother during lactation. as noted above the present study assessed the enzymatic activity and the production of enzymes fucosidasas various strains belonging to this genus using glucose as a carbon source capable of producing enzymes that can catalyze fucosidasas enzymatic reactions to synthesize fucooligosaccharides similar to those present in the Human milk, for this purpose were evaluated eight strains of the genus *Bifidobacterium* as: *B.infantis* 14431, *B. infantis* 17930, *B.longum*, *B. bifidus*, *B. animalis*, *B.lactis*, *B. breve* and *B. adolescentis*. For growth culture media were used MRS and also for propagation TPY medium. Fermentations were conducted for 12 hours so as to increase its spread, in order to have the organism in exponential phase, and thus perform the enzymatic activity assay was performed spectrophotometrically for this fucoside Nitrophenol was used in concentration of 1mg/mL. In the cell for carrying out the test were placed 900µL of PNP-fucoside and 100µL of fermented medium. Thus was obtained the increase in absorbance over time, also performed a standard curve for the PNP-fucoside concentration calculations, these data further enzyme activity was calculated from the strains that showed enzymatic activity,

these enzymes were *Bifidobacterium infantis* 14431, *B. infantis* 17930, *B. longum* and *B. bifidus*.

1. Introducción

Desde hace algunas décadas, los científicos se percataron de los grandes aportes a la salud humana de los microorganismos clasificados como probióticos, razón por la que han cobrado gran relevancia y por ello se promueve su uso en productos alimenticios. Entre los microorganismos clasificados como probióticos, encontramos al género *Bifidobacterium* que son los más abundante en el tracto digestivo de los recién nacidos, ya que su desarrollo se favorece por los oligosacáridos que están presentes en la leche materna; en conjunto aportan grandes beneficios al hospedero como la disminución de microorganismos patógenos en el tracto digestivo, la inhibición de la adhesión de toxinas, la producción de ácidos orgánicos, la reducción de la duración de las diarreas infecciosas, y contribuyen a favorecer el equilibrio de la microbiota colónica. La leche materna contiene más de 130 oligosacáridos distintos, que constituyen el tercer componente de ésta. Los oligosacáridos más abundantes en la leche humana son libres (no conjugados) y neutros, algunos de ellos contienen fucosa. La fracción de oligosacáridos no digerida en la leche materna estimula el crecimiento de bifidobacterias en el colon. Esta flora tiene efectos benéficos y de protección frente a infecciones entéricas, de esta manera los fucooligosacáridos son una parte esencial del sistema inmunológico innato por el cual la madre protege de patógenos durante la lactancia.

Las enzimas fucosidasas son catalizadores con una elevada especificidad, se clasifican como hidrolasas y rompen el enlace glucosídico de polisacáridos y oligosacáridos. *In vitro* son capaces de sintetizar oligosacáridos de peso molecular bajo, por lo tanto, una vía para la síntesis de oligosacáridos similares a los de la leche humana es mediante el empleo de fucosidasas, por ello es necesario realizar investigaciones y crear las condiciones adecuadas para desarrollar las técnicas de obtención de fucosidasas a partir de bifidobacterias, que nos permitan sintetizar oligosacáridos similares a los de la leche humana, para desarrollar fórmulas maternizadas con fucooligosacáridos para infantes lactantes, que les suministren estos elementos que en la actualidad ninguna fórmula maternizada comercial contiene.

2. Bifidobacterias

2.1. Historia de las Bifidobacterias

El género *Bifidobacterium* fue identificado y descrito en 1889 en el Instituto Pasteur. El nombre está formado por dos palabras que provienen del latín *bifido* que procede de *bifidus* cuyo significado es de dos cabezas (en forma de Y), (Ishibashi col., 1997) *ybacterium* que es la palabra latinizada de la palabra griega *bakteria* (en forma de bastón, vara o varilla). Tissier (1900) observó y aisló de las heces de bebés una bacteria cuya morfología era nueva, en forma de **Y**. A principios del siglo pasado, la taxonomía estaba basada en un criterio relacionado con la morfología, por lo que Tissier aisló la primer cepa del género, a la que nombró *Bacillus bifidus*. En Italia un investigador de apellido Moro, aisló una bacteria, según él, diferente a la que Tissier había descubierto y la clasificó como *Lactobacillus*. Más tarde, Holland (1920) la nombró *Lactobacillus bifidus*. A partir de su descubrimiento (1900) y hasta 1957 hubo muy poco conocimiento en torno al microorganismo. En 1917 Winslow propuso clasificarla en el género *Lactobacillaceae*. En 1924, Orla-Jensen reconoció la existencia del género *Bifidobacterium* y fue el responsable de la taxonomía de las bifidobacterias ya que las reconoció como un taxón separado, pero con muchas similitudes con el género *Lactobacillus*. Dehnart (1957) propuso un esquema para la diferenciación de las bifidobacterias basado en patrones de fermentación de carbohidratos (Reuter, 1963). En 1974, la 8ª edición del manual Bergey reconoce a *Bifidobacterium* como género propio formado por 11 especies (Buchanan y Gibbons, 1974), en la 9ª edición del Manual Bergey se incluyen nuevas especies, constituyéndose el género con 33 especies, 7 de las cuales se descubrieron e incorporaron al género en la década de los 90. En la Tabla 1 podemos observar la cronología del descubrimiento del género *Bifidobacterium* (Collado, 2004). Todos estos investigadores han contribuido al conocimiento de estos microorganismos y gradualmente han descubierto sus características (Ventura y col., 2004). Hoy en día con el descubrimiento y secuenciación del genoma completo de *Bifidobacterium longum* en conjunto con otras iniciativas recientes para secuenciar otras cepas del mismo género se espera contribuir a aumentar la información para establecer la relación entre varias cepas (Ventura y col., 2004).

Tabla 1. Cronología del descubrimiento del género *Bifidobacterium* (Collado, 2004).

Nombre	Autor	Año
<i>Bacillus bifidus</i>	Tissier	1900
<i>Bacteroides bifidus</i>	Castellani y Chalmers	1919
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Manual Bergey´ eds.1-4	1923-1934
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Holland	1920
<i>Bacterium bifidus</i>	Orla-Jensen	1924
<i>Tisseria bifida</i>	Lehmann y Neumann	1927
<i>Nocardia bifida</i>	Pribram	1929
<i>Actinomyces bifidus</i>	Vuillemin	1931
<i>Actinobacterium bifidum</i>	Nannizzi	1934
<i>Lactobacillus acidophilus</i> . <i>var.bifidus</i>	Puntoni	1937
<i>Lactobacillus parabifidum</i>	Weiss y Rettger	1938
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Prevot	1938
<i>Cohnistreptothrix bifidus</i>	Manual Bergey´ eds.5-7	1938
<i>Corynebacterium bifidum</i>	Negrovi y Fisher	1938
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Olsen	1939-1957
5 grupos de bifidobacterias	György	1944
Descripción de especies humanas	Dhnert	1949
Nuevas species animales	Reuter, Mitsuoka y Scardovi	1969
Familias actinomycetae, género <i>Bifidobacterium</i> constituido por 11 especies	Holdemann y Moore Manual Bergey´ eds.8	1969-1972
Género <i>Bifidobacterium</i> constituido por 33 especies	Manual Bergey´ eds.9	1974
Orden bifidobacteriales , familia <i>Bifidobacteriaceae</i>	Stackebrandt y col	1990
Géneros <i>Bifidobacterium</i> y <i>Gardnella</i>	Stackebrandt y col	1997
<i>Aeriscardovia</i> , <i>Parascardovia</i> y <i>Scardovia</i>	Jiang y col	2002
Género <i>Bifidobacterium</i> constituido 28 especies	Actualidad	2004

2.2. Morfología del género *Bifidobacterium*

La morfología de este género consiste en bacilos pleomórficos que se ubican individualmente, en cadenas o en grupos, pueden adoptar diversas morfologías con extremos en forma de espátula, forma de letra Y, V y T, dicha morfología es variada y depende del medio de cultivo en el que se desarrollen. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Todas las especies son Grampositivas (Sela, 2011), salvo *Gardnerella vaginalis* que presenta respuestas

variables a la tinción de Gram. Son anaerobios estrictos, pero algunas especies pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO₂ (Collado, 2004).

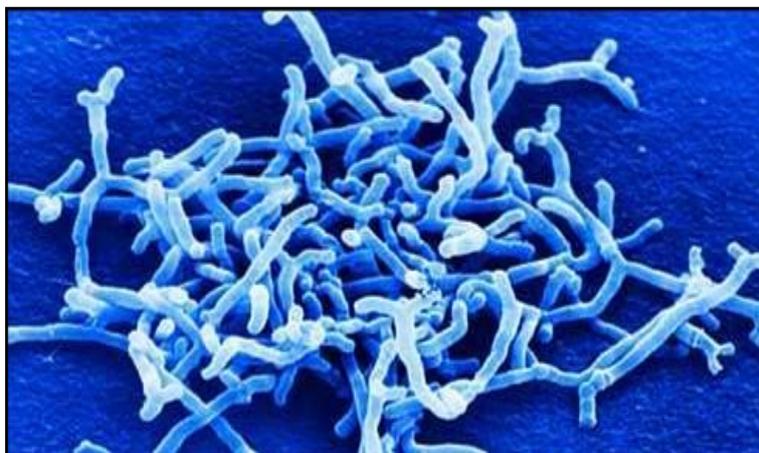


Figura1. *Bifidobacterium longum* (Optibac probiotics <http://www.optibacprobiotics.co.uk/>)

2.3. Taxonomía del género *Bifidobacterium*.

La clasificación de este género ha sido modificada desde su descubrimiento (1889), en los últimos años han aparecido nuevas cepas y otras se han reclasificado, en la actualidad el género se encuentra formado por 28 especies en total (Collado, 2004). La identificación de especies se basa en características fenotípicas y bioquímicas tales como la morfología celular, perfiles de fermentación de azúcares y la movilidad electroforética de las enzimas, lo que constituyen la primer clave taxonómica utilizada en cualquier clasificación bacteriana, no obstante, su uso resulta confuso y ambiguo. Por otra parte, se han producido cambios significativos en materia de taxonomía bacteriana desde la introducción de las técnicas moleculares, la exacta identificación de muchas especies bacterianas puede llevarse a cabo por identificación de secuencias de genes, principalmente el gen 16S rRNA, que es considerado la piedra angular de la taxonomía moderna. Todas las especies pertenecientes al género *Bifidobacterium* constituyen una unidad filogenética que exhiben el 93% de identidad entre sus secuencias 16S rRNA. En el árbol filogenético, el cluster de las bifidobacterias está posicionado dentro de las bacterias Gram positivas con más elevado porcentaje G + C junto con otros géneros tales como: *Streptomyces*, *Actinomyces* y *Propionobacterium* (Collado, 2004). En la Tabla 2 se puede observar el porcentaje molar de guanina (G) y citosina (C) en algunas bacterias en comparación con el género *Bifidobacterium*.

Tabla 2. Porcentaje molar de G + C en bacterias ácidolácticas y *Bifidobacterium* (Collado, 2004).

Género	Contenido de G + C (%)
<i>Lactobacillus</i>	34.7-50.8
<i>Streptococcus</i>	33-44
<i>Leuconostoc</i>	39-42
<i>Bifidobacterium</i>	55-67
<i>Aeriscardovia</i>	54
<i>Parascardovia</i>	55
<i>Scardovia</i>	45
<i>Gardnerella</i>	42-55

Por otro lado, la taxonomía polifásica se vale de diferentes tipos de datos e información (fenotípica, genotípica y filogenética) para la identificación de microorganismos. Diversos marcadores quimiotaxonómicos (ácidos grasos celulares, compuestos en la pared celular, exópolisacáridos y lípidos polares), además de un amplio intervalo de características (morfología, enzimología y serología), son útiles también para la identificación de microorganismos y han sido reconocidas por el International Committee on Systematic Bacteriology como herramientas nuevas en la descripción e identificación de especies (Ventura y col., 2004). En la Tabla 3 se aprecia la taxonomía del género *Bifidobacterium*.

Tabla 3. Taxonomía del género *Bifidobacterium* (Collado., 2004).

Dominio	Bacteria
Linaje	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Bifidobacteriales</i>
Familia	<i>Bifidobacteraceae</i>
Géneros	<i>Bifidobacterium</i> (28 especies) <i>Gardnerella</i> (1 especie) <i>Aeriscardovia</i> (1 especie) <i>Parascardovia</i> 1 especie) <i>Scardovia</i> (2 especies)

En la 9ª edición del Manual Bergey se incluyen nuevas especies, constituyéndose el género *Bifidobacterium* con 33 especies, 7 de las cuales se descubrieron e incorporaron al género en la década de los 90. En la Tabla 4 se aprecian 29 especies de las 33 que constituyen el género.

Tabla 4.Lista de especies pertenecientes al género *Bifidobacterium*(Collado, 2004).

Espece	Subespece	Referencia
<i>B. adolescentis</i>		Reuter, 1963
<i>B. angulatum</i>		Scardovi y Crociani, 1974
<i>B. animalis</i>	subsp. <i>animalis</i>	Mitsuoka 1969
	subsp. <i>lactis</i>	Scardovi y Trovatelli, 1974
<i>B. asteroides</i>		Meiley col., 1997
<i>B. bifidum</i>		Masco y col., 2004
<i>B. bifidum</i>		Scardovi y Trovatelli, 1969
<i>B.boum</i>		Tissier, 1900
<i>B. breve</i>		Orla-Jensen 1924
<i>B.catenulatum</i>		Scardoviy col., 1979
<i>B.choerinum</i>		Reuter, 1963
<i>B.coryneforme</i>		Scardovi y Crociani, 1974
<i>B.cuniculi</i>		Scardoviy col., 1979
<i>B.dentium</i>		Scardovi y Trovatelli, 1969
<i>B.gallicum</i>		Biavaty col., 1982
<i>B.gallinarum</i>		Scardovi y col., 1979
<i>B.indicum</i>		Scardovi y Crociani, 1974
<i>B.longum</i>	subsp. <i>longum</i>	Lauer, 1990
	subsp. <i>infantis</i>	Watabey col., 1983
	subsp. <i>suis</i>	Scardovi y Trovatelli, 1969
<i>B.magnum</i>		Sakatay col., 2002
<i>B.merycium</i>		Scardovi y Zani, 1974
<i>B.minimum</i>		Biavati y Mattarelli, 1991
<i>B.pseudocatenulatum</i>		Biavaty col., 1992
<i>B.pseudolongum</i>		Scardoviy col., 1979
<i>B.pseudolongum</i>	subsp. <i>pseudolongum</i>	Mitsuoka 1969
	subsp. <i>globosum</i>	Yaeshima y col., 1992
<i>B.psychraerophilum</i>		Simpson y col., 2004a
<i>B.pullorum</i>		Trovatelli y col., 1974
<i>B.ruminatum</i>		Biavati y Mattarelli, 1991
<i>B.saeculare</i>		Biavaty col., 1992
<i>B.scardovii</i>		Hoylesy col., 2002
<i>B.subtile</i>		Biavati y col.,1992
<i>B.thermacidophilum</i>	subsp. <i>porcinum</i>	Zhuy col., 2003
	subsp. <i>thermacidophilum</i>	Dong y col., 2000
<i>B.thermophilum</i>		Mitsuoka, 1969

2.4. Hábitats

El género *Bifidobacterium* habita en el tracto gastrointestinal en animales y seres humanos en coexistencia con una amplia variedad de microorganismos, la mayoría de los cuales son anaerobios estrictos. Antes de nacer, el tracto digestivo de los

humanos está libre de microorganismos, una vez que comienza a ser alimentado por su madre se inicia la colonización del tracto y los primeros microorganismos que lo pueblan son bifidobacterias que llegan a constituir hasta el 95% de la flora intestinal en infantes lactantes. Se ha comprobado que después de la primera ingesta de leche materna, la concentración aproximada es de 10^8 - 10^9 bifidobacterias por gramo de materia fecal (Ishibashi y col., 1997). En la Tabla 5 se aprecian especies pertenecientes al género *Bifidobacterium* encontradas en humanos, animales así como en otros hábitats y en alimentos.

Tabla 5. Lista de especies del género *Bifidobacterium* presentes en base a su origen (Biavati y col., 2000).

Humanos	Animales	Medio ambiente y Alimentos
<i>B. adolescentis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. choerinum</i>
<i>B. angulatum</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>B. minimum</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>B. boum</i>	<i>B. subtile</i>
<i>B. breve</i>	<i>B. choerinum</i>	
<i>B. catenulatum</i>	<i>B. coryneforme</i>	
<i>B. dentium</i>	<i>B. cuniculi</i>	
<i>B. gallicum</i>	<i>B. gallicum</i>	
<i>B. longum</i>	<i>B. gallinarum</i>	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. indicum</i>	
<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. longum</i>	
<i>B. scardovii</i>	<i>B. magnum</i>	
	<i>B. merycium</i>	
	<i>B. pseudolongum</i>	
	<i>B. psychraerophilum</i>	
	<i>B. pullorum</i>	
	<i>B. ruminatum</i>	
	<i>B. saeculare</i>	
	<i>B. subtile</i>	
	<i>B. thermacidophilum</i>	
	<i>B. thermophilum</i>	

2.5. Fisiología

Las bifidobacterias tienen temperaturas óptimas de crecimiento entre 37 y 41°C, ningún crecimiento ocurre a temperaturas inferiores a 20°C ni a temperaturas superiores a 45°C y no hay diferencia en cuanto a este parámetro entre cepas de origen humano y animal. Las bifidobacterias son microorganismos ligeramente tolerantes a medios ácidos, el pH óptimo de crecimiento está entre 6.5 y 7, ningún crecimiento se registra a pH superior a

8.5 ni a pH inferior a 4.5. Las bifidobacterias son microorganismos anaerobios estrictos, aunque susensibilidad al oxígeno depende de la especie y cepa(Biavati y col., 2004).

2.6. Característicasbioquímicas y metabolismo de las hexosas

Las bacterias del género *Bifidobacterium* difieren de otras del tipo ácido lácticasen que además de producir ácido láctico también producen ácido acético. Las hexosas son degradadas únicamente por la vía de la fructosa-6-fosfato(Scardovi y Trovatelli en1965). En dicha ruta la enzima aldolasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa están ausentes, mientras que la fructosa-6-fosfato-fosfocetolasa es la enzima característica del metabolismo de los azúcares por el género *Bifidobacterium*(BiavatiyMattarelli., 2006). Generalmente son microorganismos catalasa negativos, no reducen los nitratos, no fermentan el glicerol, no destruyen las proteínas coaguladas tampoco forman indol, coagula la leche sin formación de gas, no produce ácidos a partir de ramnosa, eritrol, adonitol y glicerol, por otro lado lascepas de origen humano son capaces de sintetizar vitaminascomo tiamina (B1), riboflavina (B2), vitamina B6, ácido fólico (B9), y ácido nicotínico. Cinco de estas vitaminas son sintetizadas (excepto riboflavina) por muchas especies de manera abundante, sobre todo la B6, la B9 y la B12. Algunos investigadores aseguran que*B.Bifidusy B.infantis* son excelentes productores de vitaminas, mientras que *B.breve* y*B.longum* sólo producen pequeñas cantidades y *B.adolescentis* no sintetiza ninguna de estas vitaminas.*B.breve*y *B.infantis*producen grandes cantidades de ácido nicotínico y biotina (Collado, 2004).

2.7. Estructura celular

La pared celular del género *Bifidobacterium*posee la estructura típica de las bacterias Gram-positivas, está formada por una capa de peptidoglicano que contiene polisacáridos, proteínas y ácido teicoico. La composición de aminoácidos de los tetrapéptidos básicos de mureina varía entre las especies y las cepas de la misma especie, generalmente la L-alanina, el ácido D-glutámico, la L-ornitina y la D-alanina constituyen los tetrapeptidos, sin embargo, la L-ornitina puede ser sustituida por lisina en algunas cepas. Por otro lado, la glucosa, la galactosa y la ramnosa son componentes de los polisacáridos de las paredes celulares en el género *Bifidobacterium* con diferencias cualitativas y cualitativas entre las diversas especies (Biavatiy col., 2004).

2.8. Requerimientos nutricionales

Varios aspectos nutricionales concernientes a los requerimientos complejos de nitrógeno, vitaminas, factores de crecimiento y metales, han sido estudiados extensamente. La N-acetilglucosamina y la N-acetilactosamina, que son componentes de la leche humana, estimulan el crecimiento de las bifidobacterias. Se ha demostrado que cuando los medios de cultivo tienen exceso de N-acetilglucosamina, las paredes de las células de estas bacterias presenta una morfología más regular, quizá la limitación de N-acetilglucosamina provoque que las bifidobacterias asuman una morfología ramificada, ya que es el precursor de la biosíntesis de peptidoglucanos. La proliferación de bifidobacterias en el intestino delgado de los infantes es estimulado por los componentes de las glicoproteínas; por otro lado, sabemos que la lactulosa es un factor efectivo de crecimiento y es usado en una amplia variedad de alimentos como factor bifidogénico. La lactulosa es fácilmente metabolizada por todas las especies de bifidobacterias y su crecimiento a partir de esta fuente de carbono puede conducir a la formación de células con forma de Y o V (Figura 1) (Biavati y col., 2000). La mayoría de las bifidobacterias son capaces de usar las sales de amonio (NH_4^+) como su única fuente de nitrógeno (N) (Hassinen y col., 1951). *B. bifidum* crece solamente en presencia de magnesio (Mg), manganeso (Mn) y sobre todo de Hierro (Fe). El Fe es asimilado por *B. bifidum* en sus dos formas oxidadas (Fe^{2+} y Fe^{3+}), lo cual depende de la acidez del medio (Bezkorovainy y col., 1996).

2.9. Medios de cultivo para el crecimiento de las bifidobacterias

El primer medio de cultivo mínimo desarrollado para su crecimiento (MRS) fue desarrollado por Man-Rogosa y Sharp en 1960 (De Man y col., 1960). Las exigencias nutritivas así como la necesidad de un medio anaerobio hacen que el cultivo de las bifidobacterias sea complicado. En la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo para su crecimiento, entre los cuales se pueden identificar dos tipos de medios de cultivo para el aislamiento, cultivo y caracterización de este microorganismo: medios no selectivos y selectivos.

Medios no selectivos: generalmente estos medios están constituidos por diversas sustancias como extractos de carne, peptona, extracto de levadura, zumo de tomate, sangre de caballo y leche, etc., para favorecer el crecimiento de las bifidobacterias.

Además estos medios son adicionados con sustancias para disminuir el potencial redox, como la cisteína, la cistina, el ácido ascórbico, el sulfato de sodio, etc. Dentro de este tipo de medios de cultivo destaca el medio de cultivo TPY (triptona, peptona, extracto de levadura) que fue creado por Scardovi en 1986. Este autor menciona que es el más adecuado para el aislamiento y cultivo de bifidobacterias cualquiera que sea su origen (humano y animal). En la Tabla 6 se puede apreciar los medios selectivos más empleados para el crecimiento de las bifidobacterias.

Tabla 6.Medios no selectivos empleados para el cultivo de bifidobacterias(Collado, 2004).

Medio	Autor
Man, Rogosa y Sharpe (MRS)	De Many col., 1960
Agar jugo de tomate	
Agar reforzado para clostridios	Willis y col., 1973
Briggs liver (BL)	Mitsuokay col., 1984
Agar de Sangre Columbia	Comercial
Triptona-peptona-extracto de levadura (TPY) agar	Scardovi, 1986

Medios selectivos. Los requerimientos físicos de las bifidobacterias son diversos, la reciente incorporación de estos microorganismos a los productos lácteos fermentados ha favorecido el desarrollo de medios de cultivo para diferenciar el género *Bifidobacterium* de otros géneros vinculados con los productos lácteos; inicialmente se empleó el ácido ascórbico y el sodio como sustancias selectivas. Chang y col., (1983), modificaron el medio de cultivo MRS-agar, el medio contenía cisteína y tinta china para aislar especies de bifidobacterias, por otro lado Matteuzzi y col.,(1983) adicionaron 80 µg de kanamicina/mL con el mismo objetivo. Sonokey col.,(1986) utilizaron el principio de que las bifidobacterias son capaces de metabolizar diversas clases de carbohidratos como son fructo-oligosacáridos y galactosil-oligosacáridos; treinta y dos especies han podido desarrollarse en este medio que contiene oligosacáridos del tipo de los *trans*-galactosidos como fuente de carbono. En la Tabla 7 se muestran los medios de cultivo selectivos utilizados para el crecimiento de bifidobacterias.

3. Probióticos

En la literatura se pueden encontrar diversas definiciones de la palabra probiótico. La definición ha ido evolucionando a lo largo del tiempo, Fric desarrolló una definición

más completa (Fric, 2007): los probióticos son microorganismos no patógenos, la mayoría de origen humano, los cuales proporcionan beneficios a la salud del hospedero, además incrementan la capacidad de prevenir o mejorar algunas enfermedades cuando son suministrados en concentraciones adecuadas.

En la actualidad los microorganismos considerados como probióticos pertenecen en su mayoría a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los probióticos poseen tres mecanismos para promover la salud humana.

- I. Proporcionando productos finales de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos tales como: ácidos orgánicos que pueden ser absorbidos por el hospedero, estos productos finales son capaces de influir en el estado de ánimo, niveles de energía y en las capacidades cognitivas del ser humano.
- II. Compiten exitosamente con los agentes patógenos.
- III. Estimulan la respuesta inmune del hospedero.

Es importante resaltar que los beneficios en la salud que proporcionan los probióticos se atribuyen a cepas específicas y no a especies o géneros en particular (Figuroa y col., 2011).

Tabla 7.Medios de cultivo selectivos empleados para el cultivo debifidobacterias(Collado, 2004).

Medio	Autor
RCA Agar reforzado para Clostridios (pH 5.0)	Willis y col., 1973
BSI (Panomomicina, neomicina, propionato sódico, cloruro d litio)	Mitsuoka y col.,1965
NPLN (Panomomicina, neomicina, ácido nalidixico, cloruro de litio)	Teraguchiy col., 1978
Ácido nalidixico, riboflavina, ácido piruvico	Tanaka y Mutai, 1980
YN-6 (ácido nalidixico, neomicina y verde de bromocresol)	Resnick y Levin ,1981
TOS (Transgalacto-oligosacáridos agar)	Sonoike y col., 1986
BIM-25 (a.nalidixico, polimixina, kanamicina, ácido iodoacético y trifeniltetrazolio)	Muñoa y Pares, 1988
Ácido propionico pH 5.0	Beerens,1990
Dicloxacilina	Sozziy col., 1990
X-α Gal	Chevalier,1991
LP (cloruro de litio y propionato sódico)	Lapierrey col., 1992
mMRS	Arroyo y col., 1994
RCA con azul prussia	Ghoddushi y Robinson,1996
Transgalacto-oligosacáridos y propionato sódico	Ji y col., 1994
Sangre, glucosa agar con oxgall y gentamicina	Limy col., 1995
BFM	Nebray col., 1999
MRS-BCD (MRS con oxgall, cisteína y dicloxacilina)	Ingham, 1999
TPY con 50µg/ mLmupirosina	Simpson y col., 2004b

En el tracto intestinal humano habitan más de 400 especies bacterianas que inciden en la prevención de enfermedades. En la Figura 2 se observa la cantidad aproximada de bifidobacterias y otros microorganismos presentes en el tracto digestivo del ser humano en las diversas etapas de la vida, junto con los cambios de la microbiota en diversas etapas de la vida. En pocos años los probióticos han evolucionado de forma importante, la selección de una cepa como probiótico requiere que sus efectos fisiológicos benéficos para el ser humano sean demostrados, que la cepa sea de origen humano y de uso seguro para el mismo, que sea estable al ácido y la bilis, y que se adhiera a las células de la mucosa intestinal, así como que reduzca la presencia de agentes patógenos en el tracto digestivo y que colabore para formar una flora intestinal equilibrada. Como ya se mencionó, las bifidobacterias, entre otros géneros, son microorganismos que cumplen con estos requisitos y que por ende, son clasificados como probióticos se encuentran las bacterias ácido láctico, las cepas clasificadas como probióticos (Amores y col 2004).

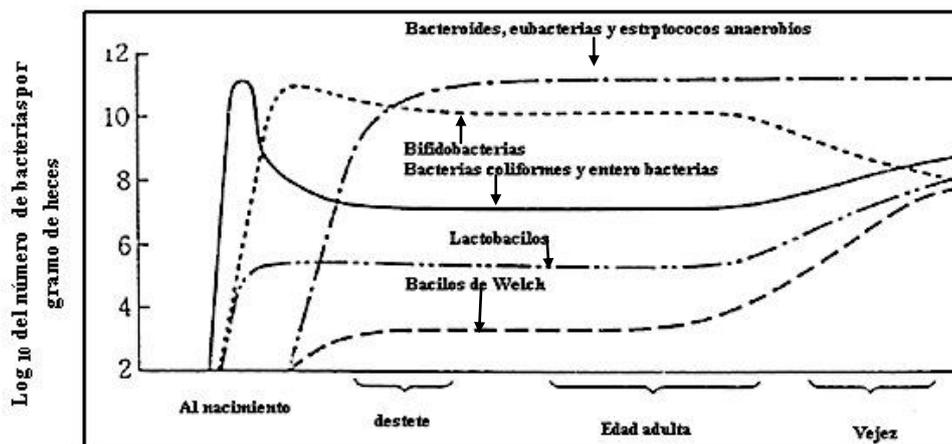


Figura2. Cambio de la flora intestinal en las diversas etapas de la vida (Mitsuoka, 1978).

3.1. Mecanismos de acción de los probióticos (bifidobacterias) para proteger al ser humano

Diversos experimentos llevados a cabo con animales y estudios *in vitro* han demostrado que las bifidobacterias ejercen una acción protectora contra la adherencia, colonización y reproducción de los microorganismos y agentes enteropatógenos. En la Tabla 8. Se agrupan los principales mecanismos de protección, al ser humano, por las bifidobacterias y otros probióticos mediante diversos mecanismos de acción. Entre los mecanismos más significativos que se han propuesto están los siguientes:

- i. La privación de los nutrientes a los microorganismos patógenos: los nutrientes se encuentran presentes en cantidad muy limitada en el intestino si las bifidobacterias y los probióticos consumen dichos nutrientes, por lo tanto limitan su proliferación.
- ii. Bloqueo de receptores: las bifidobacterias compiten con los microorganismos patógenos no solo por los nutrientes también por el espacio físico, por lo tanto se cree que las bifidobacterias y los otros probióticos pueden inhibir la adherencia de los microorganismos patógenos a los sitios receptores por medio de un mecanismo de obstrucción estérica o de bloqueo específico del receptor, con lo que se evita la colonización de microorganismos patógenos, debido a la inhibición competitiva en los sitios de adhesión.
- iii. Producción de sustancias con actividad antimicrobiana: las bifidobacterias, lactobacilos y estreptococos producen diversas sustancias antimicrobianas como son: bacteriocinas, ácidos grasos volátiles de cadena corta, peróxidos de

hidrógeno y ácidos lácticos, con ello reducen el pH luminal y se sabe que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos que no soportan el medio ácido y este es el principal mecanismo empleado por bifidobacterias y demás probióticos para inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos como *E.coli*, *Streptococcus* *Salmonella*.

Tabla 8. Bifidobacterias y otros probióticos que presentan mecanismos de acción y de protección al ser humano (Amores y col., 2004)

Acción	Mecanismo	Ejemplo
Prevención de la colonización por microorganismos patógenos	Bloqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia por nutriente	<i>L.rhamnosus</i> GG, <i>L. plantarum</i> , <i>S.boulardii</i>
Actividad antimicrobiana	Producción de sustancias Con actividad antimicrobiana. (H ₂ O ₂ , bacteriocinas, ácidos orgánicos)	<i>L.rhamnosus</i> GG, <i>S.boulardii</i>
Inmunomoduladora	Regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular	<i>L.rhamnosus</i> GG, <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp.
Actividad enzimática	Disminución de la actividad enzimática asociadas con la síntesis de lactosas, procarcinógenos, etc.	<i>S.thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp, <i>Bifidobacterium</i> spp.

- iv. Regulación de la respuesta inmunitaria: estudios recientes *in vitro* han demostrado que las bifidobacterias y los microorganismos probióticos producen metabolitos que modifican directamente la permeabilidad epitelial y refuerzan la integridad de la barrera, pueden restaurar una permeabilidad epitelial perturbada y fortalecer la barrera intestinal. Por otra parte, diversos investigadores han demostrado la capacidad antitumoral que tienen las bifidobacterias y los microorganismos probióticos.
- v. Disminución de la actividad enzimática: no se sabe con exactitud el mecanismo de acción, sin embargo se ha demostrado la capacidad de los probióticos para disminuir la actividad enzimática de la β-glucuronidasa que está vinculadas con la síntesis de procarcinógenos (Amores y col., 2004).

trisacáridos se consideran como oligosacáridos núcleo a partir de los cuales se sintetizan los oligosacáridos complejos de la leche humana que pueden ser lineales o ramificados (Nam y col., 2011).

4.1. Oligosacáridos de leche humana y bifidobacterias

La reciente secuenciación del genoma de *Bifidobacterium infantis* ha proporcionado una mayor comprensión acerca su relación con los OSLHy su crecimiento en estos sustratos. Se sabe que estos compuestos estimulan el desarrollo de las bifidobacterias. Sela (2008) reportó que esta especie posee 43 Kb un cluster que codifica para cuatro glicosil-hidrolasas necesarias para romper los OSLH en sus monosacáridos constituyentes (sialidasas, fucosidasas, galactosidasas y hexosaminidasas), así como genes relacionados con el transporte de oligosacáridos; en la Figura 4 se observan los pares de bases que codifican las enzimas antes mencionadas. De esta forma comienza la degradación de los OSLH para ser asimilados por las bifidobacterias.

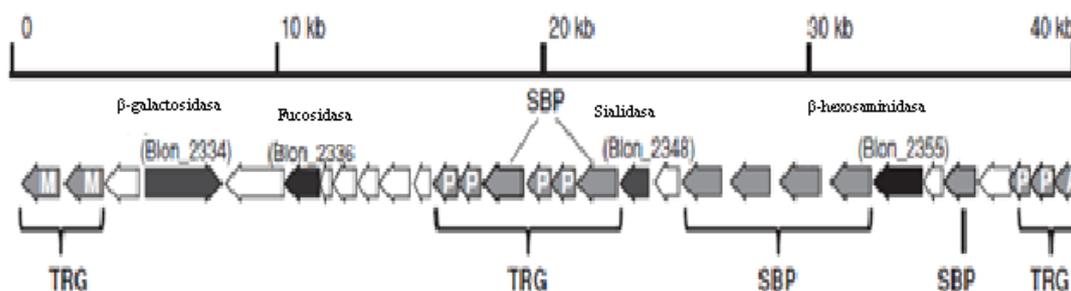


Figura 4. Pares de bases (Kb) que codifican glicosil-hidrolasas requeridos para metabolizar oligosacáridos de leche humana (Chichlowski y col., 2011).

El análisis proteómico reveló que los genes en este locus son inducidos para llevar a cabo la síntesis de las enzimas que hidrolizan los OSLH. Entre las diversas funciones que desempeñan los OSLH en las bifidobacterias, esta la de formar parte de la pared celular, se ha demostrado que la acetilglucosamina obtenida de la hidrólisis de los OSLH pasa a formar parte de la pared celular. Otros componentes de la leche humana que favorecen el predominio de la flora bifidógenas: la lactoferrina, los nucleótidos, ciertas proteínas y el fosforo. Son bifidógenos, debido a que promueven el desarrollo de las bifidobacterias (Miñana, 2007).

5. Fucosidasas

Las fucosidasas son esenciales y por consiguiente son enzimas abundantes en todos los organismos vivos que cuentan con procesos para el metabolismo de carbohidratos. Estas enzimas pertenecen a las llamadas glicosidasas las cuales desempeñan una función hidrolítica. *In vivo* rompen enlaces glucosídicos para formar monosacáridos u oligosacáridos y poseen un alta especificidad, aunque también se ha observado que bajo ciertas condiciones *in vitro*, tiene la capacidad de formar enlaces glucosídicos. Su peso molecular varía de 20 a 100 kDa y la mayoría de las fucosidasas trabaja a pH muy cercano a la neutralidad (Zhiang y col., 2003).

5.1. Clasificación y mecanismos de reacción

En 1991, Henrissat propuso una clasificación de las glicosidasas a las cuales pertenecen las α -fucosidasas, basadas en la secuencia de aminoácidos similares. Las glicosidasas con un alto grado de homología en su secuencia fueron asignadas en las mismas familias y se clasifican empleando los siguientes criterios:

- I. Las características estructurales del plegado de la enzima.
- II. La relación evolutiva entre las enzimas.
- III. Su mecanismo catalítico.

Toda esta clasificación es complementaria a la de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), basada en la especificidad del sustrato de la enzima. En la actualidad más de 100 familias están clasificadas. Aunque la información es muy limitada acerca de las enzimas de las bifidobacterias, es conocida la estructura de más de 50 familias de glicohidrolasas que pueden ser de gran utilidad en la clasificación de las enzimas producidas por el género *Bifidobacterium* (Lambertus y col., 2008). La base de datos de enzimas activas de los carbohidratos (CAZY) ofrece una lista actualizada de las familias glucósido-hidrolasas. Actualmente se han clasificado en esta base de datos, dos L-fucosidasas en dos familias de enzimas que son GH29 y GH95 (glycoside hidrolase) (Ashida y col., 2009). Las fucosidasas (glucósido hidrolasas) son un grupo amplio de enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y una fracción no-carbohidrato. Esta clasificación se basa en similitudes de secuencia de aminoácidos y su relación directa con plegamientos, tal clasificación:

- (i) Refleja las características estructurales de estas enzimas, mejor que solo tomar en cuenta la especificidad de sustrato.
- (ii) Ayuda a revelar las relaciones evolutivas entre estas enzimas.
- (iii) Proporciona una herramienta útil para obtener información sobre el mecanismo de reacción.
- (iv) Ilustra la dificultad de derivar las relaciones entre miembros de la familia y la especificidad de sustrato.

Según la IUBMB, estas enzimas pueden ser clasificadas por la especificidad del sustrato o por su mecanismo de acción (Náterciay col., 2012). Existen dos tipos de α -L-fucosidasas: las exo-fucosidasas y las endo-fucosidasas. Las primeras hidrolizan enlaces glucosídicos en los extremos de las cadenas de oligosacáridos, mientras que las segundas ejercen su acción hidrolítica en medio de las cadenas de oligosacáridos (Zhiang y col., 2003). Por su mecanismo de reacción se clasifican como α -fucosidasas de retención o de inversión los cuales se obtiene como resultado la retención o la inversión de la configuración anómerica. Por otro lado, el tipo de reacción química involucrada en dichos mecanismos es una sustitución nucleofílica de primer orden.

5.2. Las Fucosidasas en el género *Bifidobacterium*

Se han reportado diversos estudios sobre el genoma de *B. bifidum* y *B. infantis* en los que se encontraron los sitios que codifican para las fucosidasas (Tabla 9). Turróni y col (2010) secuenciaron el genoma de *B. bifidum* PRL2010 y lo compararon con el de otras cepas: 324B, 85B, D5M 20456, 156B, A8, L22 y D119. Se encontró que en la PRL2010, la 324B, la 156B, la L22 y la D19 coincidieron en la expresión de los genes que codifican para la producción de fucosidasas, favorecida por la presencia de mucina en el medio.

Tabla 9. Estudios del genoma del género *Bifidobacterium* que mostraron zonas que codifican para fucosidasas.

Cepa	Referencia
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> 15697	Sela y col. 2008
<i>B. longum</i> subsp <i>infantis</i>	LoCascio y col. 2010
<i>B. bifidum</i> PRL2010	Turróni y col., 2010.
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	Sela y col., 2012.

Se han caracterizado algunas fucosidasas. En la Tabla 10 se muestran algunas características de las fucosidasas que han sido clonadas de *Bifidobacterium bifidum*.

Tabla 10. Fucosidasas clonadas del género *Bifidobacterium*.

Cepa	Enzima	Familia	Referencia
<i>B. bifidum</i> JCM1254	1,2- α -L-fucosidasa.	GH 95	Katayama y col., 2004.
<i>B. bifidum</i>	1,2- α -L-fucosidase	GH95	Nagae y col. 2007
<i>B. bifidum</i> JCM1254	1,3–1,4- α -L-fucosidase	GH 24	Ashida y col., 2009.

GH family: familia glucósido hidrolasa.

5.3. Absorción de carbohidratos e inducción de enzimas en el género *Bifidobacterium*

El género *Bifidobacterium* juega un papel muy importante en la fermentación de los carbohidratos en el colon; la mayoría de los oligosacáridos y los polisacáridos son degradados a monosacáridos e ingresan a la vía de las hexosas para convertirse en ácido acético y ácido láctico así como ácidos grasos de cadena corta. Las α -fucosidasas pueden encontrarse extracelularmente, asociadas a la membrana bacteriana o intracelularmente, con actividad asociada a polisacáridos complejos como la mucina y ligada a un extenso conjunto de transportadores de azúcares anidados en las membranas. En las Figuras 5 y 6 se muestran el mecanismo por el cual las fucosidasas producidas por *Bifidobacterium longum*, rompen las moléculas de los carbohidratos para introducirlas al interior de las células. Se presume que este podría ser el modo de acción de las fucosidasas intracelulares o ligadas a la pared celular (Lambertus y col., 2008).

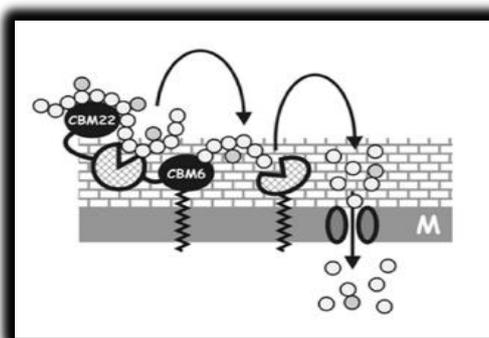


Figura 5. Mecanismo de degradación de la molécula de arabino-xilano por *Bifidobacterium longum* (Lambertus y col., 2008).

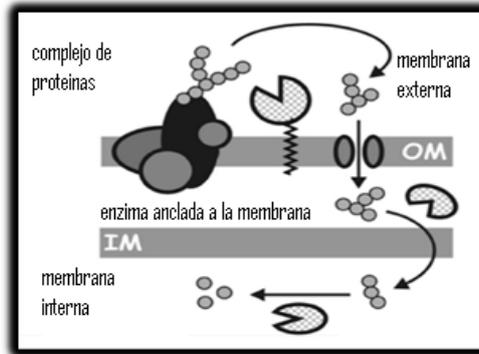


Figura 6. Mecanismo de actuación de la α -amilasa para la degradación de almidón (Lambertus y col., 2008).

6. Justificación

Los beneficios potenciales a la salud de los oligosacáridos de leche humana han sido estudiados con un enfoque en su efecto prebiótico. A pesar del hecho de que los oligosacáridos de leche humana juegan un papel clave por su impacto benéfico en los lactantes, están ausentes de las fórmulas maternizadas debido a la falta de métodos de producción industrial. Actualmente en las fórmulas maternizadas se adicionan galactooligosacáridos y fructooligosacáridos como una alternativa para promover una microbiota bacteriana en los lactantes que les permita estar protegidos de los microorganismos patógenos; sin embargo, es de suma importancia crear los medios y técnicas científicas adecuadas para poder suministrar a los lactantes los fucooligosacáridos presentes en la leche humana, por otro lado las bifidobacterias forman parte de la microbiota natural de el tracto digestivo, y una característica de los microorganismos considerados como probióticos es que son bacterias aisladas del tracto digestivo de un individuo saludable e introducidas nuevamente en el intestino, a través de algún vehículo alimenticio. El vehículo más común son las leches fermentadas como lo son: yogurt, kéfir, yakult. Las bifidobacterias han demostrado ser microorganismos clasificados como microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS), y cumplen con los requerimientos de la Federal Drug Administration (FDA U.S.A.): no ser patógenos ni asociados con la producción de toxinas dicha institución considera GRAS a una enzima producida por un microorganismo GRAS. Es por ello que las bifidobacterias son un probiótico conveniente para la síntesis de oligosacáridos.

En el presente proyecto se evaluará la presencia de fucosidasas en diversas especies de bifidobacterias, con el objetivo de obtenerlas para emplearlas en la síntesis de fucooligosacáridos y posteriormente diseñar fórmulas maternizadas apropiadas que proporcionen a los lactantes los oligosacáridos necesarios para su sana alimentación.

7. Hipótesis

Las bifidobacterias son capaces de producir fucosidasas que puedan ser empleadas en la síntesis de fucooligosácaridos semejantes a los encontrados en la leche humana.

8. Objetivos

8.1.General

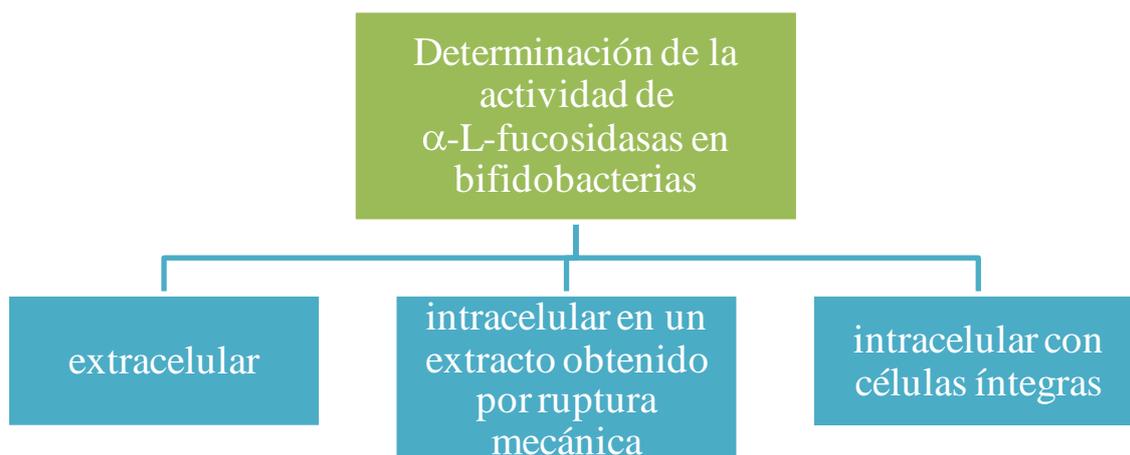
Evaluar la actividad de la enzima α -L-fucosidasa en ocho cepas de bifidobacterias:

Bifidobacterium infantis 17930, *Bifidobacterium infantis* 14431, *Bifidobacterium longum*,
Bifidobacterium bifidus, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*,
Bifidobacterium breve y *Bifidobacterium adolescentis*.

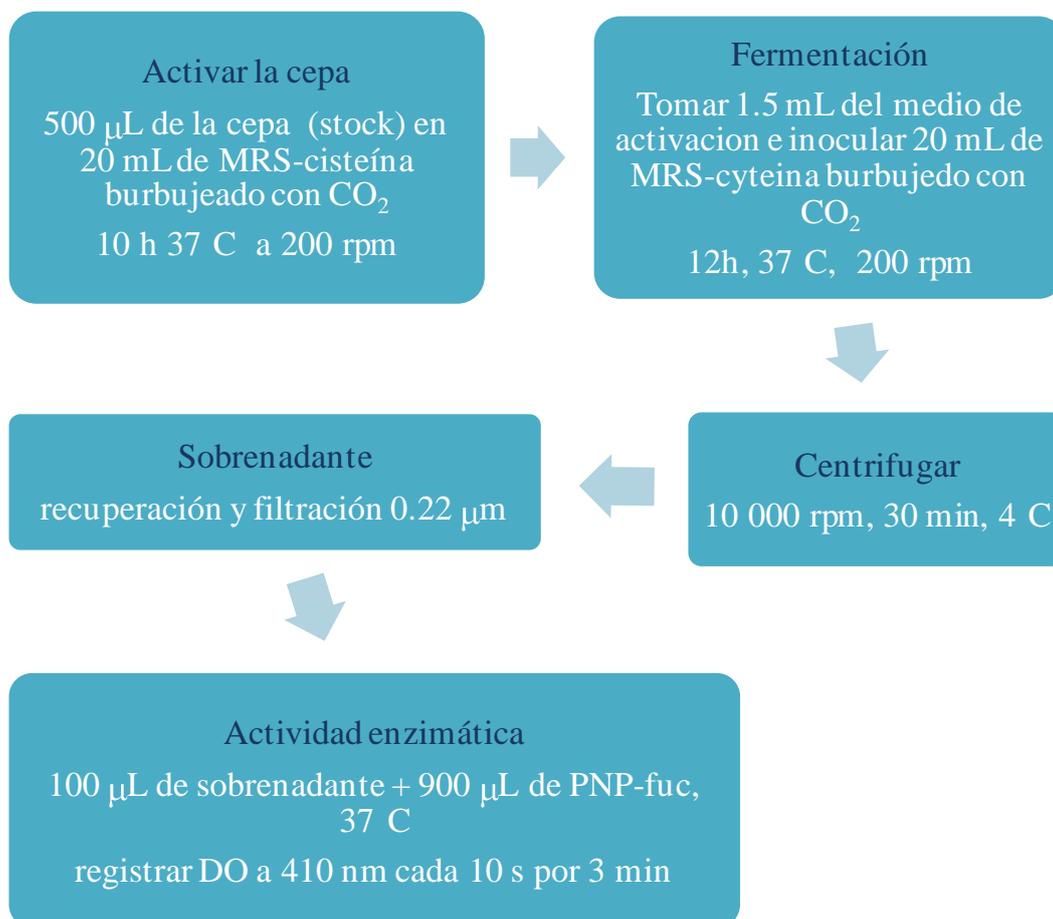
8.2. Particulares

1. Determinar la producción extracelular de α -fucosidasa de cada cepa en MRS.
2. Determinar la producción extracelular de α -fucosidasa de cada cepa en MRS.
3. Determinar la producción de α -fucosidasa de cada cepa en MRS con las células íntegras.
4. Elaborar las curvas de crecimiento de las cepas con actividad fucosidasa.

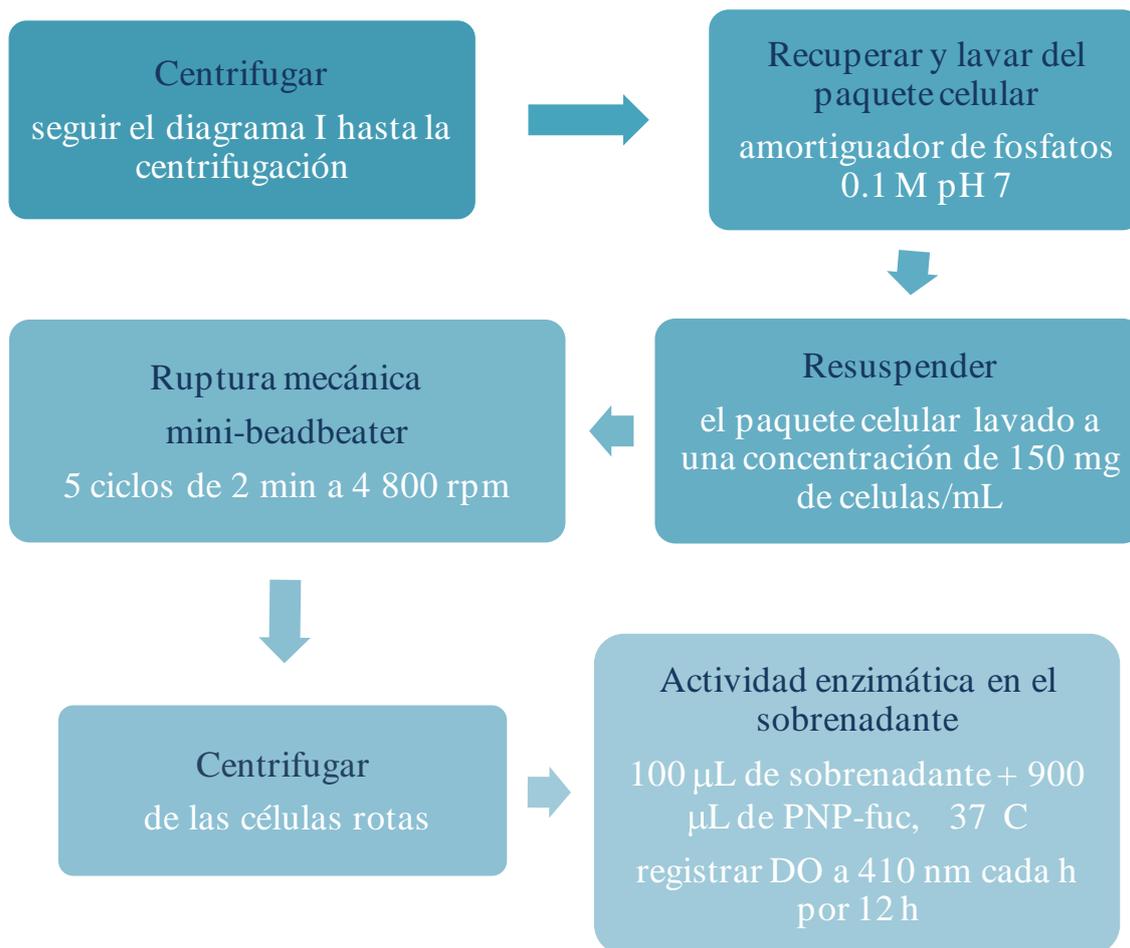
9. Desarrollo experimental.



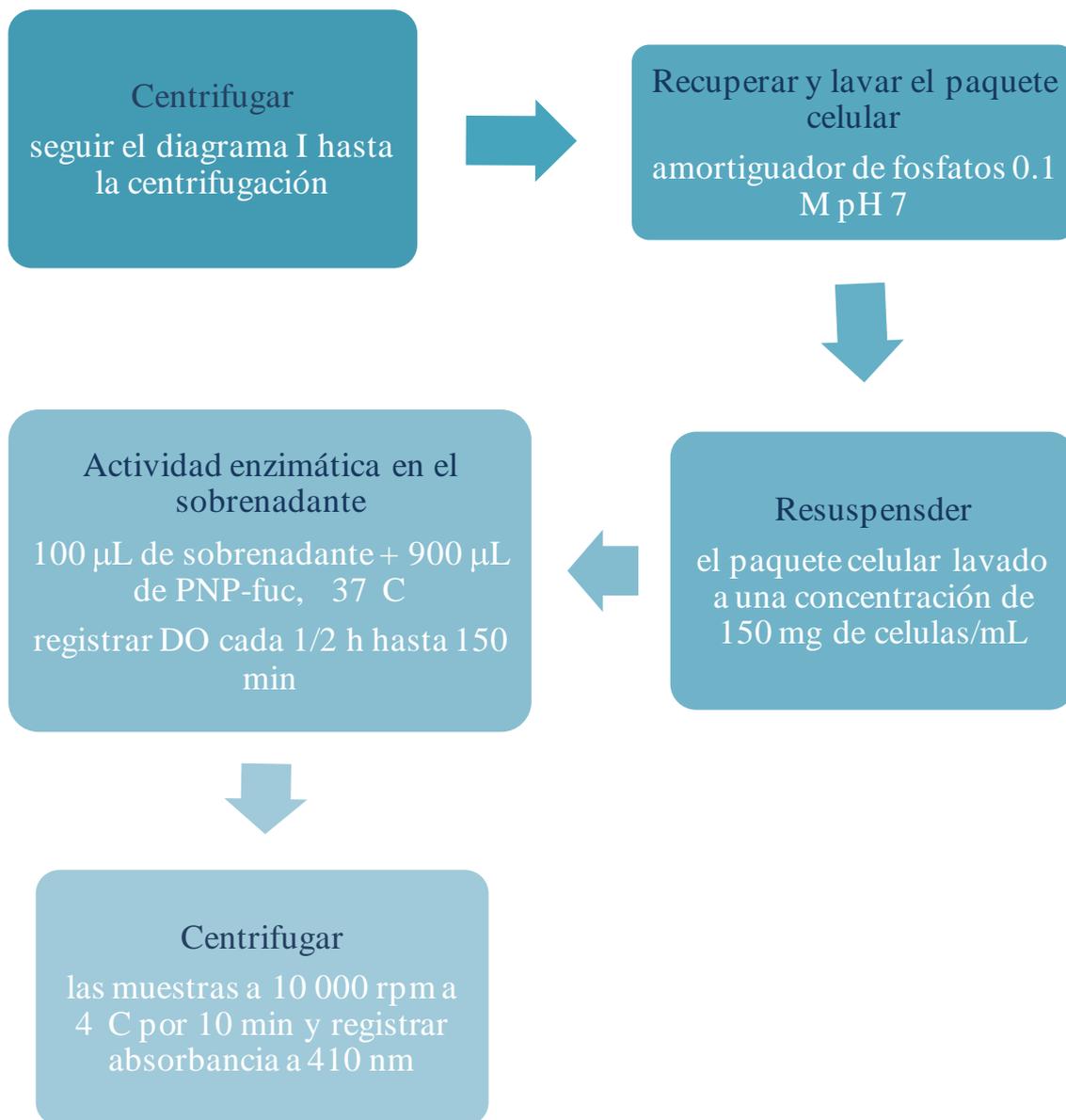
I. Determinación extracelular de fucosidasas en bifidobacterias.



II. Determinación de actividad fucosidasas intracelular.



III. Determinación de fucosidasas intracelulares en células completas.



10. Materiales y Métodos

10.1. Microorganismos

Las cepas utilizadas en este estudio forman parte del cepario de la UAM-Xochimilco y fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Rina González-Cervantes: *Bifidobacterium infantis* 17930, *B. infantis* 14431, *B. longum*, *B. bifidus*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. brevey*, *B. Adolescentis*.

10.2. Medios de cultivo.

MRS. El medio de cultivo MRS-cisteína se preparó y se distribuyó con 20 mL del medio en botellas serológicas; así mismo, se burbujeó con CO₂ durante un minuto por frasco y fue sellado con tapones de goma y anillos de aluminio; los botellass se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120°C durante 15 minutos. Este medio fue empleado para la activación del microorganismo. En la Tabla 11 se puede observar la composición del medio de cultivo MRS (De Man y col; 1960)

Tabla 11. Composición del medio de cultivo MRS.

Componentes	Cantidad (g/L)
Peptona	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
D-glucosa	20.0
Acetato sódico	5.0
Citrato triamónico	2.0
Sulfato magnésico	0.2
Sulfato manganeso	0.05
Agar bacteriológico	17.0
Polisorbato 80	1 mL
L-cisteína	0.5

TPY. El medio se preparó y distribuyó en frascos serológicos con 20 ml, además se burbujeó con CO₂ cada frasco durante un minuto y fue sellado con tapones de goma y anillos de aluminio; el medio se esterilizó en autoclave a una temperatura de 120°C durante 15 minutos. Este medio se empleó para el crecimiento del microorganismo, con

el objetivo de propagarlo. En la Tabla 12 se puede observar la composición del medio de cultivo TPY.

Tabla 12. Composición del medio de cultivo TPY.

Componentes	Cantidad (g/L)
Peptona de caseína	10
extracto de levadura	2.5
peptona de soya	5
L-cisteína	0.5
glucosa	5
tween 80,	1 ml
K ₂ HPO ₄	2
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5
ZnSO ₄	0.25
CaCl ₂	0.125
FeCl ₃	0.03

Medio Kabel. El medio se preparó y distribuyó en frascos serológicos con 5 ml y cada frasco se burbujeó con CO₂ durante un minuto y fue sellado con tapones de goma y anillos de aluminio; se esterilizó el medio en autoclave a una temperatura de 120°C durante 15 minutos. Este medio (Tabla 13) se empleó para la fermentación del microorganismo con diferentes fuentes de carbono (Kabel y col., 2002).

Tabla 13. Composición del medio de cultivo Kabel.

Componentess	Cantidad (g/L)
Base de nitrógeno	6.7
L-cisteína	0.5
Tween 80	1ml
Solución de sales al 40%	
CaCl ₂	0.2
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
NaHCO ₃	10
NaCl	2
N-Z-amina	0.5
Tioglicolato	0.05

10.3. Preparación del Stock

Para la activación de los microorganismos, tomó un tubo del stock con 500 μL de la cepa y se agregó a un frasco serológico estéril con 20 mL de medio de cultivo MRS-cisteína. El período de activación fue de 10 h a 37°C y 200 rpm. Después de 10 h, se transfirieron 1.25 mL del medio de cultivo MRS fermentado, a un frasco serológico con 20 mL de medio de cultivo TPY. El período de crecimiento fue de 12 h a 37°C y 200 rpm. Una vez concluido este período se centrifugó todo el medio fermentado, a una velocidad de 8 000 rpm a 4°C por 15 min. Transcurrido el tiempo, se eliminó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 10 mL de solución salina isotónica (0.85%), se llevó de nuevo a centrifugación en las condiciones antes mencionadas. Se eliminó de nuevo el sobrenadante y el paquete celular, se mezcló con 3 mL de MRS-glicerol (1:1 v/v) y se homogenizó, para finalmente dispensar 500 μL (microorganismo-MRS-glicerol) un tubo Eppendorf (6 en total). Se conservaron los tubos a -20°C , para su uso posterior.

10.4. Determinación de curva de crecimiento

Para la curva de crecimiento, se inoculó un eppendorff del stock (500 μL) en MRS-cisteína con un volumen de 20 mL y se incubó durante 10 h, para su activación, concluido este período se transfirieron 1.5 mL a otro frasco de 20 mL de MRS-glucosa, para su crecimiento, durante 12 h y finalmente se transfirieron 1.5 mL a otro frasco de MRS-glucosa el cual fue llevado a 37°C y 200 rpm para realizar la curva de crecimiento, en el que se registró la absorbancia a 660 nm y el pH.

10.5. Ensayo para la determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente. El ensayo enzimático fue llevado a cabo usando 4-nitrofenil α -L-fucopiranosido (PNP-fucosa), como sustrato sintético, compuesto fenólico que tiene un grupo nitro en la posición para, con respecto al grupo hidroxilo y una molécula de fucosa, la cual será hidrolizada en presencia de la enzima α -fucosidasas. El 4-nitrofenol al ser liberado por la ruptura enzimática del PNP-fucosido, produce una coloración amarilla que tiene un máximo de absorbancia de 410 nm (Martearena, 2007). Para ello se preparó una solución de

1mg/mL de PNP-fucosa en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7 (K_2HPO_4 y KH_2PO_4). El tubo con la mezcla de reacción contenía 900 μ L de PNP-F con 100 μ L de muestra.

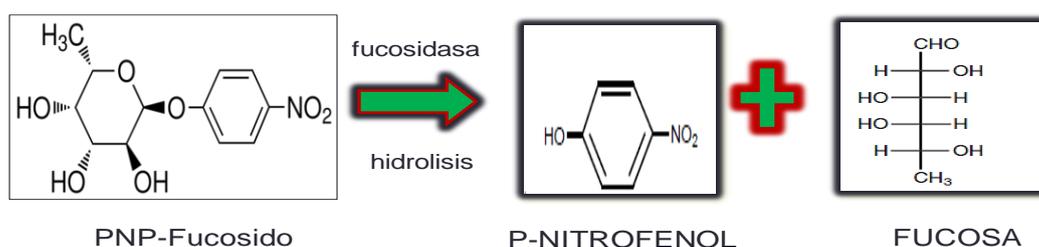


Figura 7. Hidrólisis de PNP-fucosido por medio de la fucosidasa.

10.6. Determinación de la actividad extracelular

Una vez fermentado el medio, se centrifugó (20mL) a 10000 rpm a 4°C por 30 min. El sobrenadante se separó del botón de células y se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m. Por otra parte, el botón de células fue resuspendido en buffer de fosfatos 0.1M pH 7 y almacenado en congelación para su empleo posterior (para la determinación de la actividad enzimática intracelular por ruptura celular). Se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se mezclaron con 900 μ L de PNP-fucosa y se midió la absorbancia a 410 nm.

10.7. Determinación de la actividad enzimática intracelular por ruptura mecánica.

El botón de células obtenido de la determinación de la actividad enzimática extracelular, se mezcló con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7 en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 150 mg de biomasa/mL. En un tubo se colocaron las perlas de vidrio de 0.1 mm (perlas de vidrio sin lavar de $\leq 106 \mu$ m) junto con la suspensión celular (1 mL). Inmediatamente los tubos se llevaron al congelador durante 10 min para posteriormente proceder a la ruptura celular en un aparato mini-beadbeater (marca Biospec), a cada tubo se le aplicaron 5 ciclos a una velocidad de 4800 rpm y durante 2 min/ciclo. Una vez concluida la ruptura, se centrifugaron los viales a 10000 rpm a 4°C por 30 min. Al final del tratamiento, se filtró el medio a través de una membrana de 0.22 μ m. Para la determinación de la actividad enzimática se mezclaron 100 μ L del filtrado con 900 μ L de PNP-fucosa.

10.8. Determinación de la actividad enzimática en células completas.

Después de ser activado el microorganismo durante 24 h en medio de cultivo MRS-cisteína, el medio se centrifugó a 10000 rpm a 4°C por 30 min. El sobrenadante se eliminó y el botón de células se mezcló con buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7 en cantidad suficiente para obtener una concentración de 150 mg de biomasa/mL. Se mezclaron 100 µL de la suspensión celular con 900 µL de PNP-fucósido y se llevó a un baño maría a 37°C. Se realizó una cinética de 150 minutos, se registro la absorbancia a 410 nm cada 30 min.

11. Resultados y Discusión

11.1. Determinación de la actividad enzimática extracelular en medio Kabel

Se evaluó la actividad de α -fucosidasa de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium longum* en medio Kabel con 5 diferentes fuentes de carbono (Tablas 14, 15 y 16). Los resultados obtenidos del análisis de la actividad enzimática de las muestras la reacción con el PNP-Fucosido se muestran para cada fermentación a 24, 30 y 40 h, con las diferentes fuentes de carbono y se observa que los valores calculados de las pendientes son muy pequeños en todos los casos, para los tres microorganismos. Los resultados obtenidos en estos ensayos presentaron importantes desviaciones entre los duplicados, lo cual no permitió ver la diferencia entre los valores obtenidos a lo largo del tiempo (valores no mostrados). Por otro lado, la fuente de carbono suministrada en el medio fue de 5 g/L, menor al de otros medios reportados para el crecimiento de bifidobacterias. Por ello, se decidió trabajar solo con medio MRS que cuenta con una concentración de 20 g/L de glucosa.

Tabla 14. Actividad enzimática de la fermentación de *Bifidobacterium breve* sobre diferentes sustratos.

Sustrato	Actividad enzimática (Abs/s)
Fucosa 24	1.65×10^{-5}
Fucosa 30	4.5×10^{-6}
Fucosa 40	2×10^{-5}
Mucina 24	2×10^{-5}
Mucina 30	6×10^{-5}
Mucina 40	7×10^{-6}
Glucosa 24	5×10^{-6}
Glucosa 30	1×10^{-7}
Lactosa 24	1.45×10^{-5}
Lactosa 30	5.45×10^{-6}
Lactosa 40	9×10^{-5}
Galactosa 24	5×10^{-5}
Galactosa 30	1.5×10^{-5}
Galactosa 40	3.95×10^{-5}

Tabla 15. Actividad Enzimática en la fermentación de *Bifidobacterium lactis* sobre diferentes sustratos.

Sustrato	Actividad enzimática (Abs/s)
Fucosa 24	7×10^{-6}
Fucosa 30	8×10^{-5}
Fucosa 40	3.5×10^{-5}
Mucina 24	1.95×10^{-3}
Mucina 30	2×10^{-5}
Mucina 40	2×10^{-5}
Glucosa 24	1.4×10^{-5}
Glucosa 30	2×10^{-6}
Glucosa 40	1×10^{-5}
Galactosa 24	6×10^{-5}
Galactosa 30	5×10^{-5}
Galactosa 40	1.1×10^{-5}
Lactosa 24	8.5×10^{-5}
Lactosa 30	6.5×10^{-5}
Lactosa 40	2.5×10^{-5}

Tabla 16. Actividad enzimática en la fermentación de *Bifidobacterium longum* sobre diferentes sustratos.

Sustrato	Actividad enzimática (Abs/s)
Fucosa 24	1.2×10^{-5}
Fucosa 40	5×10^{-5}
Mucina 24	1.1×10^{-4}
Mucina 30	6×10^{-6}
Mucina 40	1.35×10^{-4}
Glucosa 24	8×10^{-6}
Glucosa 30	2×10^{-5}
Glucosa 40	9.5×10^{-5}
Galactosa 24	3×10^{-5}
Galactosa 30	4.7×10^{-5}
Galactosa 40	6.5×10^{-5}
Lactosa 24	2.5×10^{-5}
Lactosa 30	2×10^{-5}
Lactosa 40	9×10^{-5}

11.2. Determinación de la actividad enzimática extracelular en medio MRS

Para determinar la actividad enzimática se obtuvo una curva patrón de ONP con la siguiente ecuación $Y=1.8266X$, que permitió transformar las absorbancias en concentraciones de ONP ($\mu\text{mol/mL}$) para graficar todas las concentraciones en función del tiempo y calcular la pendiente obtenida en la ecuación, que es la velocidad de reacción de la fucosidasa presente. En la Tabla 17 se pueden apreciar las actividades enzimáticas obtenidas a partir de los valores del anexo (sección 14.1) para los ocho cepas estudiadas. La actividad enzimática más alta es la correspondiente a la *Bifidobacterium breve* $1 \times 10^{-1} \mu\text{mol ONP/mL} \cdot \text{min}$. En la literatura se menciona que las bifidobacterias (*B. infantis* y *B. bifidum*) producen enzimas α -L-fucosidasas que pueden encontrarse extracelularmente asociadas a la membrana bacteriana (ancladas) o intracelularmente (Lambertus y col., 2008).

Tabla 17. Actividad enzimática extracelular de las diferentes cepas de bifidobacterias evaluadas.

Cepa	Velocidad ($\mu\text{mol ONP/mL} \cdot \text{min}$)
<i>B. longum</i>	3.9×10^{-2}
<i>B. infantis</i> 14431	8.1×10^{-2}
<i>B. infantis</i> 17930	6.0×10^{-3}
<i>B. lactis</i>	1.0×10^{-2}
<i>B. animalis</i>	7.0×10^{-3}
<i>B. adolescentis</i>	9.0×10^{-3}
<i>B. bifidus</i>	1.0×10^{-2}
<i>B. breve</i>	1.0×10^{-1}

11.3. Determinación de la actividad enzimática intracelular en *B. infantis* por ruptura mecánica en medio MRS

La literatura menciona que el género *Bifidobacterium*, por sus características genéticas, puede sintetizar *in vivo* enzimas α -L-fucosidasas intracelulares y extracelulares ancladas a la pared celular (transmembranal) (Lambertus y col., 2008). La actividad enzimática intracelular determinada en células rotas de *B. infantis* 17930 fue de $8.9 \times 10^{-2} \mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$. Los datos que permitieron el cálculo de esta actividad se muestran en Anexo (sección 14.1). A partir de este valor y en base al peso de las células húmedas, se determinó la actividad específica que fue de $5.9 \times 10^{-4} \mu\text{mol/mg biomasa} \cdot \text{min}$.

11.4. Determinación de la actividad enzimática intracelular con la célula completa en medio MRS.

Los ensayos para la determinación de la actividad enzimática intracelular con células se realizaron en las ocho cepas. En la Tabla 18 se puede apreciar los resultados obtenidos de la determinación de la actividad enzimática a las 24 h de fermentación. En esta tabla se aprecia claramente que la cepa con mayor actividad enzimática fue *Bifidobacterium longum* seguida, en orden descendente por *B. infantis* 17930, *B. infantis* 14431 y *B. bifidus*. En la fermentación de *B. adolescentis*, *B. lactis*, *B. breve* y *B. animalis* no se obtuvo actividad enzimática.

Tabla 18. Actividad enzimática y específica de *B. longum*, *B. infantis* 1739, *B. infantis* 14431 y *B. bifidus*.

Cepa	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{mg biomasa} \cdot \text{min}$)
<i>B. longum</i>	2.9655	1.63×10^{-2}
<i>B. infantis</i> 17930	2.4386	1.98×10^{-2}
<i>B. infantis</i> 14431	0.3308	2.20×10^{-3}
<i>B. bifidus</i>	0.283	1.89×10^{-3}

Los resultados de las actividades enzimáticas, confirmaron la presencia de enzimas α -L-fucosidasas en células cultivadas en el medio MRS. En cuanto al ensayo para la determinación de actividad enzimática intracelular en *Bifidobacterium infantis* 17930, se encontró actividad, sin embargo, dado que solo se pudo llevar a cabo una sola determinación, no es un resultado concluyente. Se puede inferir que en los dos casos antes mencionados se producen enzimas constitutivas, a diferencia de las enzimas reportadas previamente (Tabla 10) las cuales fueron obtenidas por clonación y, por tanto inducidas, según Katayama y col. (2004) y Ashida y col. (2009). Cuando la actividad se midió en células completas, se obtuvo mayor actividad enzimática, lo que nos hace pensar que la enzima está anclada a la pared celular externa, como lo explica Lambertus y col. (2008) quien reportó la existencia de enzimas transmembranales. En contraste, en el ensayo mecánico las enzimas posiblemente son destruidas durante el tratamiento, por ello, se encontró menor actividad enzimática.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observó que la concentración de bacterias es importante para lograr la reproducibilidad de las técnicas

montadas. Durante la fermentación de *Bifidobacterium infantis* 17930, *Bifidobacterium infantis* 14461, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidus*, se pudo observar autoagregación intermedia y elevada, que es la recomendada alcanzar para obtener la concentración de microorganismos adecuada para mejorar la reproducibilidad en los ensayos (Morshedur y col., 2008).

11.5. Crecimiento en medio con glucosa como fuente de carbono

La finalidad de realizar las curvas de crecimiento para las diversas cepas fue comprobar si las cepas crecían con la fuente de carbono suministrada. Las curvas de crecimiento y de pH de las ocho cepas evaluadas se muestran en las Figuras 8 y 9. En la figura 8 se puede apreciar que la *Bifidobacterium bifidus* fue la cepa que presentó el mayor crecimiento, seguida en orden descendente por *B. infantis* 14431, *B. longum* y finalmente *B. infantis* 17930. En la figura 9 se puede apreciar que la cepa de *Bifidobacterium adolescentis* obtuvo la mayor absorbancia, seguido de *B. animalis*, *B. breve* y finalmente *B. lactis*. Todos los microorganismos comienzan su fase exponencial de crecimiento entre las 2 y las 4 h de fermentación. Por otro parte, en las figuras 8 y 9 también se puede observar que la disminución del pH es similar para todas las cepas. Se puede apreciar como al aumentar la concentración de microorganismos disminuye el pH por la producción de ácido durante la fermentación; en la parte final de las curvas de pH, se las células ya no son capaces de crecer y se puede producir la muerte de los microorganismos así como la lisis. Cabe señalar que estos microorganismos son heterofermentativos y producen ácido acético y láctico como producto final de la vía de las hexosas (Pokusaeva y col., 2011).

EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE FUCOSIDASAS POR BIFIDOBACTERIAS

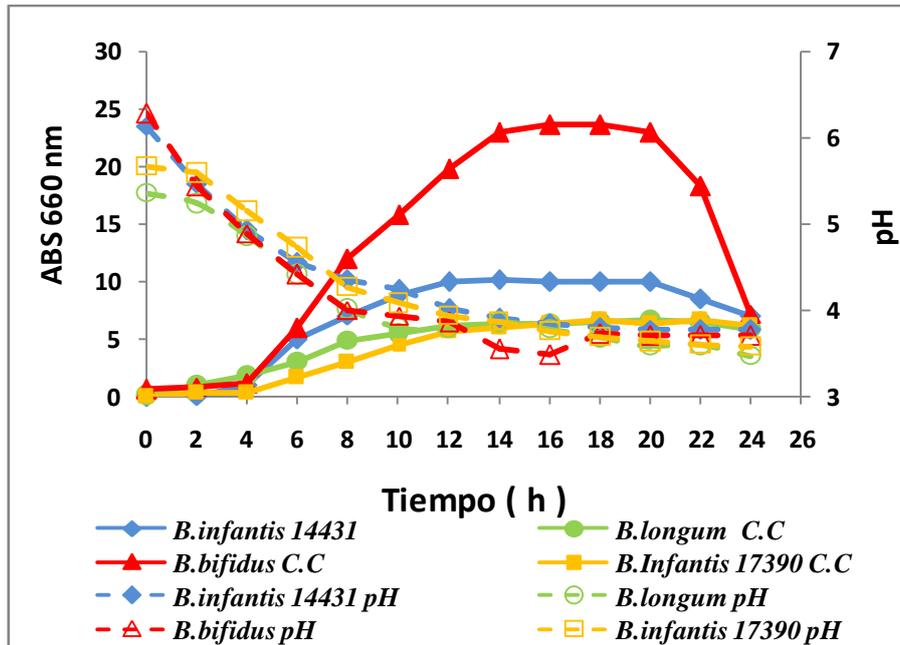


Figura 8. Curva de crecimiento (C.C.) y evolución del pH de *B. infantis* 17390, *B. infantis* 14431, *B. longum* y *B. bifidus* en MRS.

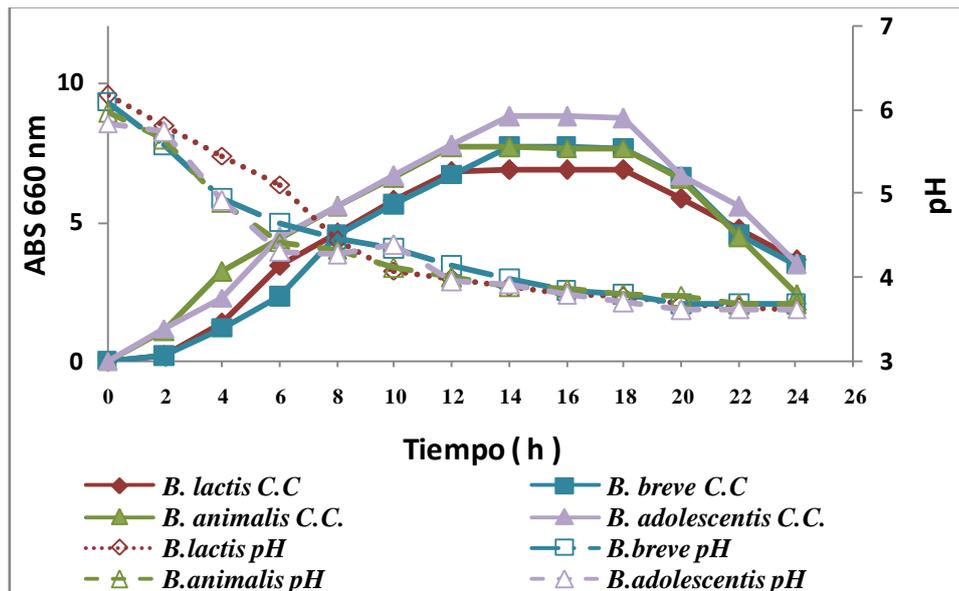


Figura 9. Curva de crecimiento (C.C.) y evolución de *B. lactis*, *B. animalis*, *B. breve* y *B. adolescentis* en MRS.

12. Conclusiones

- En *B. longum*, *B. infantis*17930,*B. infantis* 14431 y*B. bifidus* se encontró actividad enzimática de α -L-fucosidasas con las células completas.
- *Bifidobacterium longum* presentó la mayor actividad enzimática en células completas.
- Se determinó la actividad extracelular de las 8 cepas en cinco sustratos con una baja concentración de fuente de carbono (5 g/L) y no se encontró actividad en ningún caso.
- Se encontró actividad enzimática intracelular cuando se hizo la ruptura mecánica con células de *Bifidobacterium infantis*17930.

13. Bibliografía

1. Amores R. Calvo A., Maestre J.R. y Martínez-Hernández D. (2004). Probióticos. *Rev. Española de Quimioterapia* 17:131-139.
2. Arroyo L., Cotton L. y Martin J. (1994). Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. *Cultured Dairy Products Journal* 29: (20-21); 23-34.
3. Ashida H., Miyake A., Kiyohara M. y Wada J. (2009). Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology* 19 (9):10-1017.
4. Beerens H. (1991). Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2418-2419.
5. Bezkorovainy A., Kot E., Miller-Catvhpole R., Haloftis G. y Furmanov S. (1996). Iron metabolism in bifidobacteria: A review. *Int. Dairy J.* 6:905-916.
6. Biavati B. y Mattarelli P. (1991). *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 163-168.
7. Biavati B., Mattarelli P. y Crociani F. (1992). Identification of bifidobacteria from fermented milk products. *Microbiologica*, 15: 7-14.
8. Biavati B., Özcan M. y Piccaglia, R. (2004). Composition and antimicrobial properties of *Satureja cuneifolia* Ten. and *Thymus brasintensis* Bornm. et. Aznav. Subsp. *isaurica* P.H. Davis essential oils. *Annals of Microbiology* 54: 393-401
9. Biavati B., Scardovi V. y Moore W. (1982). Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32:358-373.
10. Biavati B., Vescovo M., Torriani S. y Bottazzi V. (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microb.* 50: 117-131.
11. Biavati B. y Matarrelli P. (2006). The Family *Bifidobacteriaceae*. In Prokaryotes Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Scheifer K. y Stackebrandt E. Springer-New York pp. 322-382
12. Carbohydrate Active-Enzyme (en línea). Disponible en : (CAZY). <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html#nb1>. Consultado 15 de julio de 2013.

13. **Chang J., Kwon I. y Kim H.** (1983). Studies on the bifidobacteria in breast-fed Korean infant gut. *Korean Journal of Dairy Science* 5: 111-120.
14. **Chevalier P., Roy D. y Savoie L.** (1991). X- α -gal-based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. *Journal of Microbiology Methods* 13: 75-83.
15. **Chichlowski M., German B., Lebrilla C. y Mills D.** (2011). The influence of milk oligosaccharides on microbiota of infants: opportunities for formulas. *Annual Review of Food Science and Technology* 2: 331-351-
16. **Collado M.C.** (2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis de Doctorado. Valencia, Universidad de Valencia, Departamento de Biotecnología. pp.10-30.
17. **De Man J. C., Rogosa M. y Sharpe M. E.** (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130-135.
18. **Dong X., Xin Y., Jian W., Liu X. y Ling D.** (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 50: 119-125.
19. **Figuroa-González I., Quijano G., Ramírez G. y Cruz-Guerrero A.** (2011). Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(8):1341-1348.
20. **Fric P.** (2007). Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine* 2(3):237-270.
21. **Ghoddusi H. y Robinson R.** (1996). Enumeration of starter cultures in fermented milks. *Journal of Dairy Research* 63: 151-158.
22. **Hassinen J. B., Durbin G. T., Tomarelli R. M. y Bernhart F. W.** (1951). The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *Journal of Bacteriology* 62: 771-777.
23. **Henrissat B.** (1991). A classification of glycosyl hidrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280:309-316.
24. **Hoyles L., Ingana E., Falsen E., Drancourt M., Weiss N., McCartney, A., L. y Collins, M.** (2002). *Bifidobacterium scardovii* sp. nov. from human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 995-999.

25. **Ingham S. (1999)**. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* Iodo-acetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. *Journal of Food Protection* 62: 77-80.
26. **Ishibashi N, Yaeshima, T. y Hayasawa, H. (1997)**. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malaysian Journal of Nutrition* 3: 149-159.
27. **Ji G., Lee S. y Kim I. (1994)**. Improved selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* sp. *Korean Journal of Food Science and Technology* 26:526-531.
28. **Kabel A., Kortenoeven L. y Vorajen J. (2002)**. In vitro fermentability of differently substituted Xylo-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6205-6210.
29. **Katayama T., Sakuma A., Kimura T., Makimura Y., Hirakate J., Sataka K., Yamanoi T., Kumagai H. y Yamamoto K. (2004)**. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-Fucosidase (AFcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *Journal of Bacteriology* 186 (15): 4885-4893.
30. **Kimball N. 2002**. *Glossary of Biotechnology Terms*. Third edition, Washington D.C: CRC Press, 289 pp. ISBN 1-58716-122-2.
31. **Lambertus B., Hinz S., Beldman G. y Vincken J. (2008)**. *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Molecular Nutrition and Food Research* 52: 146-163.
32. **Lapierre L., Undeland y Cox., L. (1992)**. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science* 75: 1192-1196.
33. **Lauer E. (1990)**. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *International Journal of Systematic Microbiology* 40: 100-102.
34. **Lim K., Huh C. y Baek Y. (1995)**. A selective enumeration medium for Bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Research*. 78: 2108-2112.
35. **Martarena R. M. (2007)**. Estudio de síntesis enzimática de ramnósidos y oligosacáridos catalizados por α -L-ramnósidos. Tesis de Doctorado. Director

- Ellenreider- von G. Universidad Nacional de Salta. Departamento de Química. pp. 30-50.
36. **Masco L., Ventura M., Zink R., Huys G. y Swings, J.** (2004). Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* 54: 1137-1143.
 37. **Matteuzi D., Crociani F. y Brigidi P.** (1983). Sensibilité des bifidobactéries aux antimicrobiens. *Annales de l'Institut Pasteur* 134: 339-349
 38. **Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufmann P., Dasen G., Wenger S. y Teuber M.** (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Systematic Applied Microbiology* 20: 57-64.
 39. **Miñana Vitoria.** (2007). Oligosacáridos en la leche humana. *Nutrición infantil.* 65(3):129-133.
 40. **Mitsuoka T.** (1978). Intestinal Bacteria and Health. *Harcourt Brace Journal Javanovich Japan Inc .Tokio.*
 41. **Mitsuoka T., Segal T. y Yamamoto S.** (1965). Einverbesserte Methodik der qualitativen und de quantitativen Analyse der Darm flora von Menschen und Tieren. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* 195:455-469.
 42. **Mitsuoka T.** (1969). Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren. *Zentralbl Bakteriologie Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig* 210: 52-64.
 43. **Morshedur R., Kim, W., Kumura H. y Shimazaki K.,** (2008). Autoaggregation and surface Hydrophobicities of bifidobacteria. *World Journal of Microbiology. and Biotechnology* 24:1593-1598.
 44. **Muñoz F.J. y Pares R.** (1988). Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium spp.* *Applied and Environmental Microbiology* 4: 1715-1718.
 45. **Nam H., Tae-jip K., Yong P., Kim, J. y Jim-Ho S.** (2011). Biotechnological production of human milk oligosaccharide. *Biotechnology Advances.* 30(6): 1268-1278.

46. **Nátércia F., Fernandez P., y Ramos M.** (2012). Glycosidasas- A mechanistic overview. INTECH Departamento de Química e Bioquímica da Faculta de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 117-134.
47. **Nebra Y. y Blanch A.R.** (1999). A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5173-5176.
48. Optibac probiotics (en línea). United Kingdom. Disponible. Consultado el 1 de Julio de 2013. <http://www.optibacprobiotics.co.uk/>.
49. **Orla-Jensen S.** (1924). La classification des bactéries lactiques. *Le Lait*. 4:468-480.
50. **Pokusaeva K., F. Fitzgerald G. y Van Sinderen D.** (2011). Carbohydrate Metabolism in Bifidobacteria. *Gene Nutrition*. 6: 285-306.
51. **Resnick I. y Levin M.** (1981). Assessment of Bifidobacteria as Indicators of Human Fecal Pollution. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 433-438.
52. **Reuter G.** (1963). Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Abt. I Orig.* 191:486-507.
53. **Sakata S., Kitahara M., Sakamoto M., Hayashi H., Fukuyama M., y Benno Y.** (2002). Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1945-1951.
54. **Scardovi V. y Trovatelli L.D.** (1974). *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the "minimum" and "subtile" groups of new bifidobacteria found in sewage. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24: 21-28.
55. **Scardovi V. y Zani, G.** (1974). *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24: 29-34.
56. **Scardovi V., Casalichio F. y Vincenzi N.** (1979). Multiple electrophoretic forms of transaldolase and 6-phosphogluconate dehydrogenase and their relationships to the taxonomy and ecology of bifidobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29(3):12-329.
57. **Scardovi V.** (1986). Genus *Bifidobacterium*, En Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Ed. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, y J. G. Holt Williams and Wilkins :Baltimore, pp. 1418-1434

58. **Scardovi V. y Crociani F.** (1974). *Bifidobacteriumcatenulatum*, *Bifidobacteriumdentium* and *Bifidobacteriumangulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology* 24: 6-20.
59. **Scardovi V. y Trovatelli L.D.**(1965).The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*.*Annals of Microbiology*15: 19-29.
60. **Scardovi V. y Trovatelli L. D.** (1969). New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F.A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*.*Zentralbl.Bakteriol.Parasitenk.Infektionskr.Hyg.Abt. II* 123:64-88.
61. **Sela D.**(2011).Bifidobacterial utilization of Human milk oligosaccharides.*International Journal of Food Microbiology* 149: 58-64.
62. **Sela D., Garrido D., Lerno L., Wu S., Tan K., Eom H., Joachimiak A., Lebrilla C. y Mills D.** (2012). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697 α -Fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides.*Applied and Environmental Microbiology*78: 795-803
63. **Simpson P.J., Fitzgerald G.F., Stanton C. y Ross R.P.** (2004a). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed.*Journal of Microbiology Methods*. 57: 9-16.
64. **Simpson P.J., Ross R.P., Fitzgerald G.F., y Stanton, C.**(2004b).*Bifidobacteriumpsychraerophilum* sp. nov.and *Aeriscardoviaaeriphilagen*. nov. sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*54:401-406.
65. **Sonoike K., Mada M. y Mutai M.**(1986).Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk.*Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 27:238-244.
66. **Sozzi T., Brigidi P., Mignot O. y Matteuzzi D.** (1990). Use of dicloxacillin for the isolation and counting of Bifidobacteria from dairy products.*Lait* 70: 357-361

67. **Tanaka R. y Mutai M.** (1980). Improved Medium for Selective Isolation and Enumeration of *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 866-869.
68. **Teraguchi S., Uehara M., Ogasa K. y Mitsuoka K.** (1978). Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Japanese Journal of Bacteriology* 33: 753-761.
69. **Tissier H.** (1900). La putréfaction intestinale. *Bulletin de l'Institut Pasteur*. Paris.
70. **Trovatelli L.D., Crociani F., Pedinotti M. y Scardovi V.** (1974). *Bifidobacterium pollorum* sp. nov.: A new species isolated from chicken feces and a related group of Bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Archives of Microbiology* 98:187-198.
71. **Turroni F., Battacini F., Foroni E., Mulder I., Kim J., Zomer A., Sánchez B., Bidossi A., Ferrarini A., Giubellini V., Delle Donne M., Henrissat B., Coutinho P., Oggioni M., Fitzgerald G., Mills D., Margolles A., Kelly D., Van Sinderen D. y Ventura M.** (2010). Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 107(45): 19514-19519
72. **Venema K.** (2011). Intestinal fermentation of lactose and prebiotics lactose derivatives, including human milk oligosaccharide. *International Dairy Journal* .22(2): 123-140
73. **Ventura M., Van Sinderen D., Fitzgerald G.F. y Zink R.** (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 205-223.
74. **Watabe J., Benno Y., y Mitsuoka T.** (1983). *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: A new species isolated from ceca of chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 127-132.
75. **Willis A., Bullen C., Williams C., Fagg C., Bourne A. y Vignon M.** (1973). Breast milk substitute. A bacteriological study. *British Medical Journal* 4: 67.
76. **Yaeshima, T., Fujisawa T. y Mitsuoka T.** (1992). *Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* comb. nov. and *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* comb. nov. *Systematic Applied Microbiology* 15: 380-385.

77. **Zhiang J. y Shiao J. y Kowalprezemk W.G.** (2003). Enzymatic synthesis of oligosaccharides en: Carbohydrate-based drug discovery. Ed. Chi-Huey Wong Wiley VCH. Federal Republic of Germany Vol.1. pp 137-167.
78. **Zhu L., Li W. y Dong X.** (2003). Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1619-1623.

14. Anexo

14.1. Actividad enzimática extracelular e intracelular de las bifidobacterias.

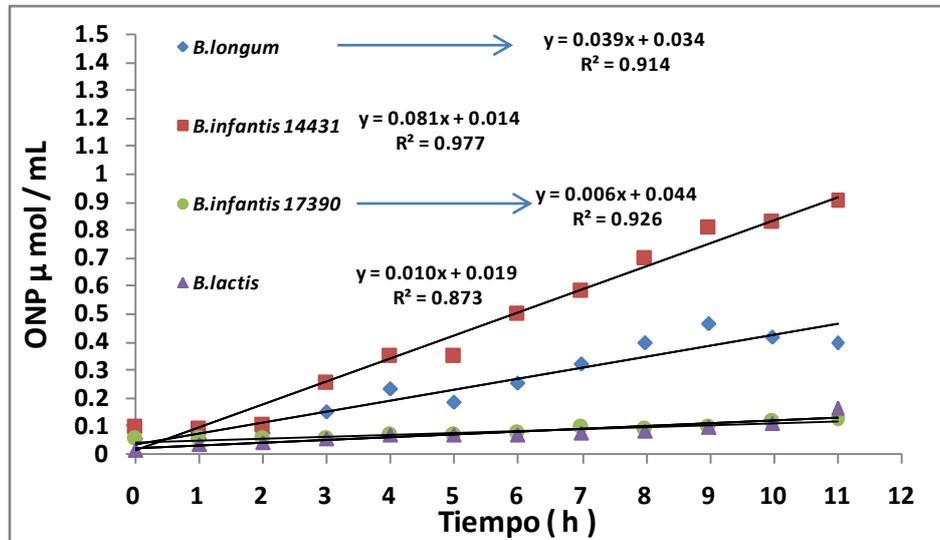


Figura .Actividad enzimática extracelular de *B. longum*, *B. infantis* 14431, *B. infantis* 17390 y *B. lactis*.

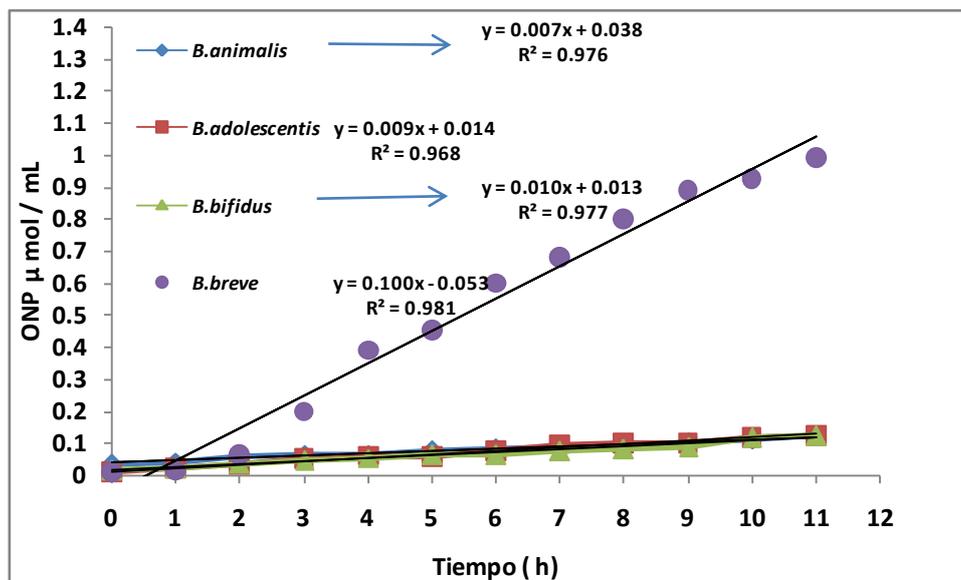


Figura. Actividad enzimática extracelular de *B. bifidobacterium*, *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. bifidus* y *B. breve*.

EVALUACION DE LA PRODUCCIÓN DE FUCOSIDASAS POR BIFIDOBACTERIAS

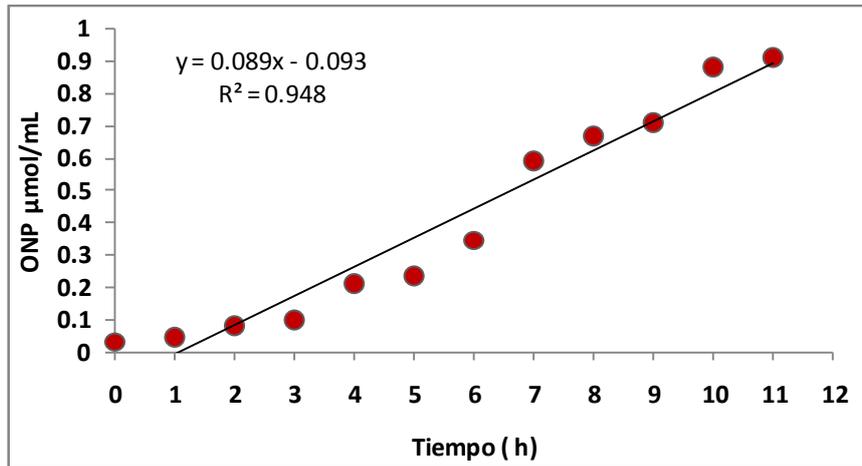


Figura. Determinación de la actividad enzimática intracelular de *Bifidobacterium infantis* 17930.

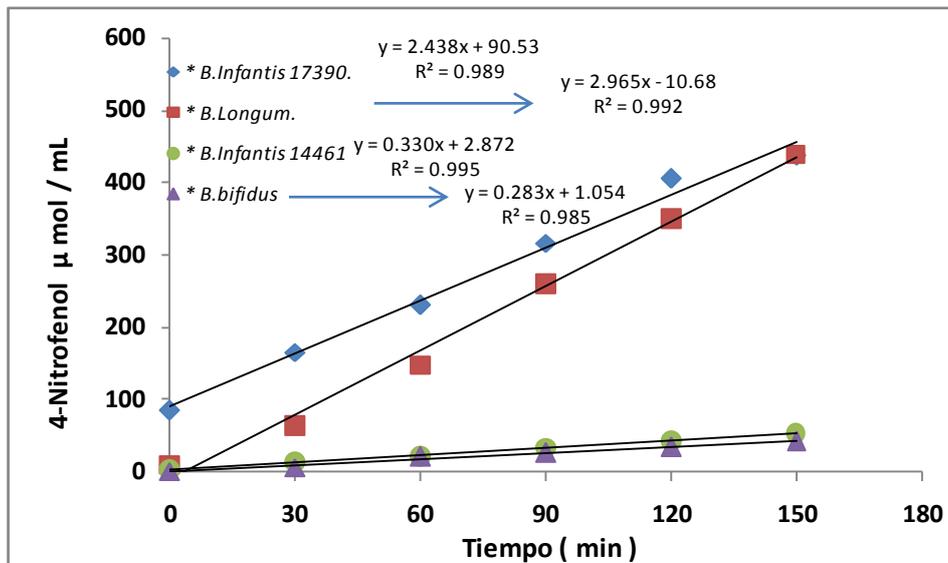


Figura. Actividad enzimática de *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* 17930, *B. infantis* 14431 y *B. bifidus* en células completas.

14.2. Curva patrón de 4 para nitrofenol fucósido

Curva patrón a partir de la cual se calcularon las concentraciones de PNP liberado en el ensayo de actividad enzimática en células completas.

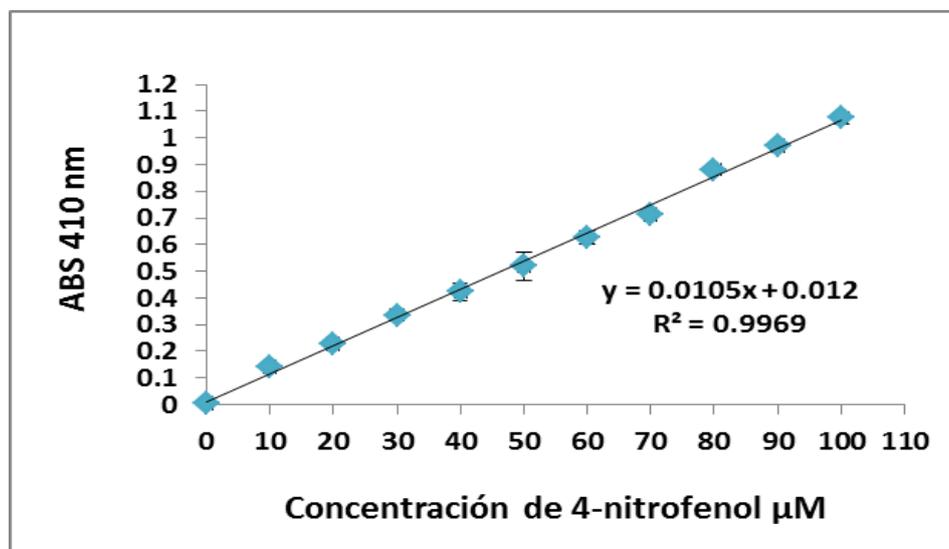


Figura 15.5. Curva patrón de 4-para Nitrofenolfucósido