

División Académica de Ciencias de la Salud



Doctorado en Ciencias Biomédicas

Tesis:

“Actividad β -fructofuranosidasa extracelular como parámetro de selección de cepas de bifidobacterias con potencial aplicación en el desarrollo de simbióticos”

Presenta: José Antonio Morales Contreras

Directores: Dra. Ángela Ávila Fernández
Dra. Isela Esther Juárez Rojop

Villahermosa, Tabasco

Marzo, 2023



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Jefatura
del Área de
Investigación



Villahermosa, Tabasco, 19 de junio de 2023

Of. No. 0556/DACS/JI

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

C. José Antonio Morales Contreras

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Presente

Comunico a Usted, que autorizo la impresión de la tesis titulada "**Actividad β -fructofuranosidasa extracelular como parámetro de selección de cepas de bifidobacterias con potencial aplicación en el desarrollo de simbióticos**" con índice de similitud1% y registro del proyecto No. **JI-PG-159**; previamente revisada y aprobada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dr. Jorge Luis Blé Castillo, Dra. Carina Shianya Álvarez Villagómez, Dra. Viridiana Olvera Hernández, , Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla, Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego, Dr. Xavier Miguel Boldo León y la Dra. Isela Esther Juárez Rojop, Lo anterior para sustentar su trabajo recepcional del **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, donde fungen como Directores de Tesis: la Dra. Ángela Ávila Fernández y la Dra. Isela Esther Juárez Rojop.

Atentamente

Dra. Mirian Carolina Martínez López
Directora

UJAT



DACS
DIRECCIÓN

- C.c.p.- Dra. Ángela Ávila Fernández.- Director de tesis
- C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop.- Director de Tesis
- C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Carina Shianya Álvarez Villagómez.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Viridiana Olvera Hernández.- Sinodal
- C.c.p.- Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Crystell Guadalupe Guzmán priego.- Sinodal
- C.c.p.- Dr. Xavier Miguel Boldo León.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Isela Esthera Juárez Rojop.- Sinodal
- C.c.p.- Archivo

DC'MCML/DC'OGME/lkrd*

Miembro CUMEX desde 2008

Consortio de
Universidades
Mexicanas

UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Av. Crnel. Gregorio Méndez Magaña, No. 2838-A,

Col. Tamulté de las Barrancas,

C.P. 86150, Villahermosa, Centro, Tabasco

Tel.: (993) 3581500 Ext. 6360, e-mail: investigacion.dacs@ujat.mx



ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Villahermosa Tabasco, siendo las 09:00 horas del día 23 del mes de mayo de 2023 se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la División Académica de Ciencias de la Salud para examinar la tesis de grado titulada:

"Actividad β -fructofuranosidasa extracelular como parámetro de selección de cepas de bifidobacterias con potencial aplicación en el desarrollo de simbióticos"

Presentada por el alumno (a):

Morales	Contreras	José Antonio
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)
Con Matricula		

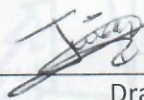
2	0	1	E	6	2	0	0	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---


Aspirante al Diploma de:

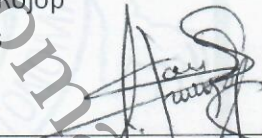
Doctorado en Ciencias Biomédicas


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


COMITÉ SINODAL

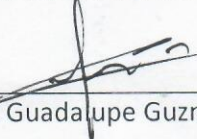

 Dra. Ángela Ávila Fernández
 Dra. Isela Esther Juárez Rojop
 Directores de Tesis

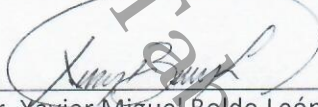

Dr. Jorge Luis Ble Castillo


Dra. Carina Shianya Álvarez V.


Dra. Viridiana Olvera Hernández


Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla


Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego


Dr. Xavier Miguel Boldo León


Dra. Isela Esther Juárez Rojop

Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 08 del mes de Mayo del año 2023, el que suscribe, José Antonio Morales Contreras, alumno del programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 201E62001 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: **“Actividad β -fructofuranosidasa extracelular como parámetro de selección de cepas de bifidobacterias con potencial aplicación en el desarrollo de simbióticos”**, bajo la Dirección de la Dra. Ángela Ávila Fernández y de la Dra. Isela Esther Juárez Rojop. Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31, el alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: angela.avila@ujat.com. Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



José Antonio Morales Contreras

Nombre Completo y Firma



Sello

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Centro de Investigación de la División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, bajo la dirección de la Dra. Ángela Ávila Fernández y la Dra. Isela Esther Juárez Rojop.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca CONACyT 884472 y el proyecto SEP-CONACYT Investigación Científica Básica 288403.

México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Índice

Abreviaturas.....	V
Resumen.....	VII
Abstract	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Las bifidobacterias y su importancia en el tracto gastrointestinal.....	3
2.3 La actividad β -fructofuranosidasa como parámetro de selección de cepas probióticas en bifidobacterias.	9
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. HIPÓTESIS.....	14
6. OBJETIVOS.....	15
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
7. METODOLOGÍA	16
7.1 Cepas de referencia.....	16
7.2 Tinción de Gram.....	16
7.3 Caracterización de la actividad β -fructofuranosidasa con las cepas de referencias	17
7.4 Esquema general de la metodología empleada para el aislamiento, selección e identificación de cepas bifidobacterianas.....	18
7.5 Aislamiento, selección e identificación de bifidobacterias a partir de lactantes sanos.	20
7.6 Extracción y cuantificación de ADN bacteriano.	21
7.7 Identificación del género <i>Bifidobacterium</i> mediante PCR.	21
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
8.1 Selección de cepas estándar de bifidobacterias para la caracterización de la actividad β -FFasa extracelular.	23

8.2	Fermentaciones con cepas estándar de bifidobacterias utilizando fructanas como fuente de carbono.	25
8.3	Análisis de la actividad α -FFasa extracelular en geles de actividad enzimática.	29
8.4	Estrategia de selección de cepas de bifidobacterias.	32
8.5	Aislamiento, selección y crecimiento de bifidobacterias a partir de heces de lactantes sanos.	33
8.6	Identificación del género mediante PCR.	38
9.	CONCLUSIONES	44
10.	PERSPECTIVAS.....	45
11.	REFERENCIAS.....	46

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática del aislamiento, selección e identificación de cepas de bifidobacterias.....	19
Figura 2. Evolución del crecimiento y pH en cultivos de <i>B. adolescentis</i> ATCC® 15703™ en medios suplementados con glucosa, fructosa, oligofructosa, agavina o inulina.	25
Figura 3. Evolución del crecimiento y pH en cultivos de <i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> ATCC® 25527™ en medios suplementados con glucosa, fructosa, oligofructosa, agavina o inulina.....	26
Figura 4. Evolución del crecimiento y pH en cultivos de <i>B. catenulatum</i> ATCC® 27539™ en medios suplementados con glucosa, fructosa, oligofructosa, agavina o inulina.	26
Figura 5. Gel de actividad al 12% suplementado con inulina de <i>Leuconostoc citreum</i> al 1%, empleando las fermentaciones de <i>B. adolescentis</i> ATCC® 15703™ en glucosa (Glu), fructosa (Fru), oligofructosa (FOS), agavina (Aga), inulina (Inu). Marcador molecular (MM). Teñido con Code Blue Stain (A) y reactivo de Schiff (B).....	30
Figura 6. Sexo de los lactantes sanos que donaron sus heces fecales.....	34
Figura 7 Crecimiento bacteriano y descenso del pH de las diluciones seriadas a partir de las heces de lactantes sanos en medio mínimo suplementado con agavina.....	35
Figura 8. Microfotografía de la tinción de gram de los cultivos líquidos en medio mínimo modificado. A: Agrupamiento 1 (sujeto 1 y 2), B: Agrupamiento 2 (sujeto 3 y 4), C: Agrupamiento 3 (sujeto 5 y 6).	36
Figura 9. Microfotografías de las bacterias aisladas en el medio mínimo modificado y sólido, teñidas mediante la técnica de Gram.....	38
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro etidio. Gradiente de temperatura de alineamiento para la amplificación del gen 16S ADNr (A), glnAI (B) y groEL (C), Marcador Molecular (MM).....	40
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro etidio. Amplificación de los genes 16S ADNr (A), glnAI (B) y groEL (C) a partir del ADNg de los aislados. Marcador Molecular (MM).....	41

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos utilizados para la identificación del género <i>Bifidobacterium</i>	22
Tabla 2. Secuencias de β -FFasas que poseen las cepas de referencia.....	24
Tabla 3. Aislados identificados como bifidobacterias de acuerdo a los marcadores moleculares 16S ADNr, glnAI y groEL.	42

Abreviaturas

AGCC. Ácidos grasos de cadena corta.

APM. Alto peso molecular

β -FFasa. β -Fructofuranosidasa

D.O.₆₀₀. Densidad óptica 600 nm.

DP. Grado de polimerización, por sus siglas en inglés.

FOS. Fructooligosacáridos.

HMOs. Oligosacáridos de la leche humana (por sus siglas en inglés).

TGI. Tracto gastrointestinal.

Glosario de términos

Cepa. Un aislado o un grupo de aislados que pueden distinguirse de otros aislados del mismo género y especie por características fenotípicas o características genotípicas o ambas.

Fructanas. Son carbohidratos no estructurales basados en fructosa, desde oligosacáridos y polisacáridos. En otras palabras, cualquier compuesto donde uno o más enlaces fructosil-fructosa (β -2,1, o β -2,6.) constituya la mayoría de los enlaces.

Inulina. Polímero de fructosa unida mediante enlaces de tipo β -2,1.

Levana. Polímero de fructosa unida mediante enlaces de tipo β -2,6.

Prebióticos. Una sustancia que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedero confiriéndole beneficios a la salud.

Probióticos. Son microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para salud del hospedero.

Simbiótico. Combinación de probiótico y prebiótico.

Resumen

Objetivo: Caracterizar la actividad β -fructofuranosidasa de las bifidobacterias y utilizarla como parámetro de selección para la identificación de cepas con potencial aplicación en el desarrollo de simbióticos. **Materiales y métodos:** Las cepas de referencia *B. adolescentis* ATCC® 15703™, *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™, y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ fueron cultivadas en medio líquido adicionado con monosacáridos o fructanas al 1% para determinar la cinética de crecimiento y el cambio de pH. Además, se colectaron 6 muestras fecales de lactantes sanos y fueron cultivadas en medio mínimo suplementado con agavina para aislar colonias, presuntamente bifidobacterias, que fueron identificadas mediante microscopía óptica y se confirmó el género por ensayos de PCR. **Resultados:** *B. adolescentis* ATCC® 15703™ fue capaz de utilizar inulina, agavina, y FOS como sustrato. En cambio, se observó poco o nulo crecimiento cuando se emplearon las cepas *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™. Por lo tanto, solo *B. adolescentis* ATCC® 15703™ utilizó fructanas largas y complejas como fuente de carbono. Por otra parte, se aislaron 12 cepas capaces de crecer en el medio mínimo adicionado con agavina, 6 de ellas fueron identificadas por PCR como bifidobacterias. **Conclusiones:** La ausencia de crecimiento en los medios de cultivo de la cepa *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ sugieren que solo las bifidobacterias que posean una β -fructofuranosidasa similar a la de *B. adolescentis* ATCC® 15703™ serán capaces de metabolizar fructanas de cadena larga y estructura compleja. Y es la actividad de esta enzima la que permite seleccionar cepas del género *Bifidobacterium* utilizando este tipo de sustratos.

Abstract

Objective: To establish a characterization model of the β -fructofuranosidase activity of bifidobacteria and use it as a selection method to identify strains with potential application in developing symbiotics. **Materials and methods:** The reference strains *B. adolescentis* ATCC® 15703™, *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™, and *B. catenulatum* ATCC® 27539™ were cultivated in a liquid medium with 1% monosaccharides or fructans to determine growth kinetics and pH change. In addition, six fecal samples from healthy infants were collected and cultured in a minimal medium supplemented with agavin to isolate colonies, probably bifidobacteria, identified by light microscopy. PCR assays consolidated the genus. Results: *B. adolescentis* ATCC® 15703™ could use inulin, agavin, and FOS as substrate. In contrast, there was little or no growth when the *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ and *B. catenulatum* ATCC® 27539™. Therefore, *B. adolescentis* ATCC® 15703™ could use long and complex fructans as a carbon source. On the other hand, 12 isolated strains can grow in the minimal medium with agavin, and PCR identified six as bifidobacteria. Conclusions: The absence of growth in the culture media of the strain *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ and *B. catenulatum* ATCC® 27539™ supporting the hypothesis that those bifidobacteria that have a group 3 β -fructofuranosidase in their genome will be capable of metabolizing long-chain fructans with a complex structure. In addition, a minimal medium with agavin could use to select strains of the genus *Bifidobacterium*.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha existido un gran interés en el estudio de los microorganismos residentes del tracto gastrointestinal humano. Puesto que, algunos microorganismos, denominados probióticos, han demostrado que proporcionan beneficios a la salud del huésped. También, se ha comprobado que estos microorganismos probióticos son estimulados selectivamente por sustancias consideradas prebióticas. Ya que, los prebióticos únicamente pueden ser aprovechados y asimilados por los microorganismos probióticos, lo que contribuye a su persistencia y supervivencia en el tracto gastrointestinal.

Por otra parte, se han observado mayores beneficios en la salud del huésped, al administrar simultáneamente un microorganismo probiótico y una sustancia prebiótica (simbiótico). De modo que, uno de los principales objetivos en el campo de investigación de los probióticos y prebióticos es la elaboración de mezclas simbióticas sinérgicas. No obstante, para crear la mejor combinación de un simbiótico sinérgico, es necesario emplear microorganismos probióticos que contengan la maquinaria enzimática capaz de metabolizar un prebiótico específico. Recientemente, se ha propuesto que la maquinaria enzimática sea considerada como marcador microbiano para la selección de nuevos microorganismos probióticos. En este sentido, el presente trabajo de investigación pretende establecer un método de selección y análisis de nuevos microorganismos con potencial probiótico, empleando para ello agavina, un carbohidrato prebiótico

ampliamente comercializado en México. Y así, contar con microorganismos que puedan ser estudiados para la elaboración de nuevos y mejores simbióticos sinérgicos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2. ANTECEDENTES

2.1 Las bifidobacterias y su importancia en el tracto gastrointestinal.

En el año de 1900 las bifidobacterias fueron identificadas por primera vez por Henry Tissier, en las heces de lactantes alimentados con leche materna (Arboleya, Watkins, Stanton, & Ross, 2016; Wong, Sugahara, Odamaki, & Xiao, 2018). Posteriormente, se ha descrito que estas bacterias están distribuidas en diversos nichos ecológicos, principalmente en el tracto gastrointestinal (TGI) de mamíferos, aves e insectos (Sun et al., 2015; Wong, Sugahara, Odamaki, & Xiao, 2018). En la actualidad, se sabe que estos microorganismos están conformados por más de 72 especies (Lugli et al., 2019). En general, las bifidobacterias se dividen en seis grupos filogenéticos principales: *Bifidobacterium longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudolongum*, *B. pollorum*, *B. asteroides* y *B. boum* (Sun et al., 2015). También, se ha sugerido que las diferencias sustanciales entre las especies de bifidobacterias son consecuencia de la adaptación al nicho ecológico donde habitan (Wong et al., 2018).

Las bifidobacterias son microorganismos Gram (+), sacarolíticas, anaerobias, y pleomórficas, las cuales se encuentran en el TGI del humano. Además, la abundancia en cantidad y número de especies bifidobacterianas se utilizan como un indicador de salud intestinal (Arboleya, Watkins, Stanton, & Ross, 2016). Asimismo, diversos estudios han demostrado múltiples efectos positivos de las bifidobacterias. Por ejemplo, la inhibición de bacterias patógenas, la restauración y el mantenimiento del equilibrio de la microbiota intestinal, la prevención de la diarrea y el incremento en la tolerancia a la lactosa. De igual forma, las bifidobacterias son capaces de reducir las concentraciones

de glucosa, colesterol y amonio en sangre, de incrementar la síntesis vitaminas y la absorción de minerales en el TGI. Es por eso que, las bifidobacterias son consideradas probióticos (Hill et al., 2014). Sin embargo, factores como la edad, el estilo de vida y la dieta modifican la composición de las bifidobacterias en el TGI (Gibson, Hutkins, & Prescott, 2017). Dentro de ellos, la dieta tiene un gran impacto, puesto que ciertos componentes de los alimentos (carbohidratos complejos, ácidos grasos poliinsaturados, etc.) que resisten la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas de mamíferos e incluso la absorción intestinal son accesibles solo a ser metabolizados por la microbiota del colón. Algunos de estos compuestos son considerados prebióticos porque estimulan el crecimiento selectivo de bacterias benéficas (Gibson et al., 2017).

Por otra parte, la composición y funcionalidad de la microbiota del TGI humano ocurre desde el nacimiento, y es relativamente estable a los dos años de vida. Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes son los principales filos en la infancia (Turroni, Duranti, et al., 2014). El género *Bifidobacterium* pertenece al filo de las Actinobacterias y representa entre el 60 y el 70 % de la microbiota intestinal en los recién nacidos, destacando las especies: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* (Turroni, Ventura, et al., 2014). No obstante, la colonización del TGI por parte de las bifidobacterias es dependiente de factores extrínsecos, tales como la transferencia vertical entre el tracto vaginal, la placenta y el líquido amniótico; la edad gestacional; y la lactancia materna exclusiva (Milani et al., 2017).

En contraste, en los adultos los niveles de bifidobacterias disminuyen significativamente hasta < 5%, pero permanecen estables (Arboleya et al., 2016).

Incluso, la composición de especies de bifidobacterias en el TGI del adulto es diferente al TGI del infante, las especies que destacan son *B. catenulatum*, *B. longum* subsp. *longum* y *B. adolescentis* (Milani et al., 2017), siendo esta última especie predominante en el TGI adulto. Del mismo modo, durante la vejez ocurre un nuevo decremento. Por todo lo anterior, se han explorado tratamientos enfocados a restablecer la microbiota intestinal mediante la adición de diversas especies de bifidobacterias mediante suplementos comerciales (Liu, Cao, & Zhang, 2015). Sin embargo, las diferencias en la distribución de las especies de bifidobacterias en los diversos grupos etarios está relacionada con el contenido de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos específicos. Así, las especies que predominan en el TGI de niños, como *B. breve* y *B. longum* subsp. *infantis* poseen genes que están involucrados en el consumo de oligosacáridos de la leche humana (HMOs, por sus siglas en inglés). En contraste, las especies sobresalientes del TGI de adultos, como *B. longum* subsp. *longum* y *B. adolescentis* contienen un alto número de genes implicados en la degradación de carbohidratos de la dieta (Milani et al., 2016).

De modo que, el conocimiento de la capacidad metabólica de las bifidobacterias, aunado a la evidencia de que estas bacterias proporcionan beneficios al huésped, han fomentado el desarrollo de diversos enfoques para estimular su crecimiento y/o actividad en el colon a través de sustancias presentes o suplementadas en la dieta (Kuo, 2017).

2.2 Las fructanas y su metabolismo en las bifidobacterias.

En particular, algunos carbohidratos prebióticos como los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina han sido extensamente estudiados por sus propiedades bifidogénicas,

biológicas y nutricionales en la fisiología humana ([Ackerman, Craft, & Townsend, 2017](#)). Tanto los FOS como la inulina pertenecen al grupo de las fructanas, polímeros de fructosa unidos mediante enlaces fructosil-fructosa de tipo β , las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes reinos como las plantas, las bacterias y los hongos.

Las fructanas se pueden clasificar por su origen, el grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés) y el tipo de enlace predominante. De acuerdo con este último criterio existen tres tipos, si el enlace es de tipo β -(2,1) son inulinas; en cambio, si es β -(2,6) son levanas y si contienen ambos tipos de enlace son llamadas graminanas o fructanas mezcladas ([Versluys, Kirtel, Toksoy Öner, & Van den Ende, 2018](#)). La agavina, una fructana obtenida de la planta de agave originaria de México, pertenece a este último grupo. Con respecto al DP, si las fructanas tienen un grado de polimerización <10 , se les conoce como fructooligosacáridos (FOS).

En general, la inulina y los FOS han demostrado ampliamente ser prebióticos bifidogénicos en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, en modelos animales y en personas sanas y con trastornos metabólicos ([Gibson et al., 2017](#)). Por ejemplo, los estudios acerca de los FOS y de la inulina han demostrado reducir los niveles séricos de colesterol y triglicéridos y el incremento en la absorción de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} ([Tódero, Rechia, & Guimarães, 2019](#)). Recientemente, la agavina ha sido empleada en ensayos clínicos como coadyuvante de la dieta baja en calorías para el control de peso en individuos con obesidad y asociada con simvastatina para el tratamiento de la dislipidemia mixta. En ambos casos, sus efectos incluyeron la disminución de los niveles de triglicéridos y del

colesterol total (Mart, Barrera-dur, Gonz, & Hern, 2016; Padilla-Camberos, Barragán-Álvarez, Diaz-Martinez, Rathod, & Flores-Fernández, 2018). La levana también ha demostrado disminuir el nivel de colesterol sérico en ratas, además, disminuyó el peso corporal, moduló la función inmunológica y aumentó la absorción de minerales (Öner, Hernández, & Combie, 2016). A pesar de ello, las aplicaciones de la levana han sido orientadas en la industria cosmética, a la elaboración de productos de belleza y cuidado personal, y en la industria farmacéutica como coadyuvante en la encapsulación de medicamentos más que por sus propiedades prebióticas (Srikanth, Reddy, Siddartha, Ramaiah, & Uppuluri, 2015).

En general, los efectos benéficos de las fructanas están relacionados con la habilidad de ciertos microorganismos como las bifidobacterias para fermentar dichos sustratos y producir metabolitos particulares a partir de ellos (Di Bartolomeo & Van den Ende, 2015). Los análisis derivados de la información obtenida a partir de proyectos de secuenciación de genomas de bifidobacterias han sugerido que su capacidad de fermentar carbohidratos complejos es extensa (Milani et al., 2016).

Por otro lado, se ha observado que los efectos de los prebióticos y probióticos son mayores cuando existe una administración simultánea de ambos (simbióticos), en comparación con su administración por separado. A esta combinación, de prebióticos y probióticos, se le conoce como simbióticos (Markowiak & Ślizewska, 2017). Los simbióticos constituyen una interesante estrategia alimenticia. No obstante, para lograr la mejor combinación posible y generar un simbiótico sinérgico, se debe llevar a cabo un

proceso de selección racional, basado en las propiedades de los probióticos para metabolizar diferentes prebióticos.

En este sentido, diversos estudios han evaluado la capacidad de diferentes cepas de bifidobacterias para utilizar FOS e inulina como sustrato para su crecimiento. Por ejemplo, [Rossi et al.](#), en 2005, evaluaron la capacidad de 55 cepas de bifidobacterias para crecer en medios suplementados con FOS e inulina. La mayoría de las cepas creció en FOS, pero solo 8 fueron capaces de utilizar inulina (promedio ~ DP 25) como fuente de carbono, entre ellas la cepa *B. adolescentis* ATCC® 15703™; [Selak et al.](#), en 2016 analizaron 190 cepas, y solo 10 crecieron en medios con inulina (~ DP 12 - 65), de las cuales 9 eran de la especie *B. adolescentis*; [Thomson, Medina, Ortúzar, Gotteland, & Garrido](#), en 2018 evaluaron el crecimiento celular de 5 bacterias representativas del TGI adulto en inulina, el mayor crecimiento celular se observó con *B. adolescentis* ATCC 15700; por último, [Rivière, Selak, Geirnaert, Van den Abbeele, & De Vuyst](#), en 2018 analizaron 18 cepas, y *B. adolescentis* B72 fue capaz de degradar todas las fracciones de FOS, y la única en degradar inulina. En contraste, pocos son los estudios donde se han identificado cepas capaces de aprovechar agavinas o levanas como fuente de carbono. En particular, [Velázquez-Martínez et al.](#), en 2014 reportó que *B. adolescentis* ATCC® 15703™ fue capaz de utilizar las tres fracciones de fructanas de agave (AFF3 ~ DP 2 – 22; AFF2 ~ DP 2-40; y AFF1 ~ DP 3 -60) y [Marx, Winkler, & Hartmeier](#), en 2000 evaluaron el crecimiento de 4 cepas diferentes en medios suplementados con FOS de tipo levana (3200 MW, DP 2- 20) y encontraron que con *B. adolescentis* DSM 20083 obtuvo un mayor crecimiento y una mayor acidificación del medio, aunque no se observó crecimiento cuando el medio fue suplementado con levana de alto peso molecular (APM).

Por todo lo anterior, estos estudios *in vitro* demuestran que no todas las bifidobacterias tienen la habilidad de metabolizar una amplia variedad de fructanas

2.3 La actividad β -fructofuranosidasa como parámetro de selección de cepas probióticas en bifidobacterias.

En general, los estudios de proteómica han permitido identificar diferentes tipos de proteínas y enzimas asociadas al metabolismo de las fructanas en las bifidobacterias. Entre ellas varios tipos de exo y endo-glicosidasas así como proteínas de unión a carbohidratos (J. H. Kim et al., 2013; Wong et al., 2018). Asimismo, algunos autores proponen que las diferencias en el metabolismo de fructanas reportadas en los estudios *in vitro*, se atribuyen al peso molecular de las fructanas y no a su tipo de enlace, aunado a la expresión de enzimas hidrolíticas.

Para hidrolizar a las fructanas las bifidobacterias poseen enzimas con actividad fructanasa, conocidas como β -fructofuranosidasas (β -FFasas). Estas enzimas pertenecen a la familia 32 de las glicosil hidrolasas (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska, Bielecki, Redzyna, & Bujacz, 2011). Teóricamente, las β -FFasas permiten a las bifidobacterias hidrolizar a los FOS, a la inulina y a la levana. A pesar de ello, tal y como se describió anteriormente, existen diferencias en la capacidad de las bifidobacterias para metabolizar fructanas (Rossi et al., 2005) y se ha propuesto que esto se debe a que las bifidobacterias se han adaptado específicamente al nicho dónde habitan (Sun et al., 2015; Wong et al., 2018) y posiblemente las propiedades bioquímicas específicas de las β -fructofuranosidasas juegan un papel importante en esta adaptación. Por ejemplo, se describió que *B. adolescentis* ALB1, una cepa capaz de crecer en inulina, expresó

actividad β -FFasa extracelular en el medio de cultivo, a diferencia de aquellas que no crecieron en inulina. Se sugirió que esta propiedad podría conferirle una ventaja sobre otras cepas y podría ser un criterio para la selección de nuevas cepas probióticas (Rossi et al., 2005). También, se reportó que la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 expresa actividad β -FFasa extracelular en medios suplementados con agavina e inulina (Cuevas-Juárez, Ávila-Fernández, & López-Munguía, 2017). Asimismo, en un estudio de proteómica con la misma cepa se reveló que expresa 2 enzimas de tipo β -FFasa en presencia de FOS e inulina. No obstante, solo hicieron la determinación de la β -FFasa intracelular y asociada a la pared (J. H. Kim et al., 2013). Posteriormente, se comprobó que la β -FFasa extracelular de la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 corresponde únicamente a la primera enzima, denominada B.longum_I1 (Cuevas-Juárez et al., 2017). Esta enzima posee características diferentes a las otras enzimas hasta el momento reportadas (Ávila-Fernández, Cuevas-Juárez, Rodríguez-Alegría, Olvera, & López-Munguía, 2016). Aunque la mayoría de las bifidobacterias poseen una enzima β -FFasa en su genoma, existen otras cepas bifidobacterianas que poseen dos β -FFasas al igual que *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. Incluso, nuestro grupo de trabajo, después de haber analizado los genomas completos de las bifidobacterias, depositados en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), propuso una clasificación de las β -FFasas hipotéticas en 3 grupos, con base en la distancia genética y las características moleculares de dichas secuencias (Morales-Contreras, Ávila-Fernández, & Melgar-Valdes, 2020). Así pues, la enzima extracelular B.longum_I1 de la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 fue clasificada dentro del grupo 3. No obstante, no se ha esclarecido si la actividad β -FFasa extracelular es dependiente de las cepas que

poseen dos β -FFasas o si las enzimas del grupo 3, como B.longum_I1, son las únicas enzimas que podrían tener actividad extracelular.

Por lo tanto, nosotros hemos planteado que la capacidad de las bifidobacterias para metabolizar fructanas largas y complejas se asocia a la presencia de la actividad β -FFasa extracelular y probablemente las enzimas del grupo 3 de nuestra clasificación. Bajo esta perspectiva, la presencia o ausencia de esta actividad extracelular podría ser un criterio para la selección de nuevas cepas probióticas. Tal y como lo proponen [Lam & Cheung](#) en [2019](#), se pueden establecer marcadores microbianos relacionados con las diferencias estructurales de los prebióticos. Singularmente, estos posibles marcadores podrían ser la maquinaria enzimática que produce un microorganismo para utilizar un prebiótico con características estructurales específicas. De modo que, sería posible identificar nuevas cepas de bifidobacterias capaces de aprovechar sustratos específicos, disponibles en el mercado y cuyo estudio ha cobrado importancia recientemente, como es el caso de las agavinas y las levanas. Con este conocimiento se pueden proponer dichas cepas para futuros estudios en los que se evalúe su capacidad simbiótica.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bifidobacterias son microorganismos probióticos residentes del TGI humano. Factores como la dieta modifican la composición en cantidad y variedad de especies bifidobacterianas. Por consiguiente, las estrategias farmacéuticas e industriales para estimular el crecimiento selectivo de las bifidobacterias en el intestino se enfocan en suplementar la dieta con carbohidratos prebióticos y con cepas bifidobacterianas. Hasta la fecha, existe gran cantidad de información sobre los efectos prebióticos de los FOS y la inulina y recientemente se han reportado los efectos prebióticos de la agavina, fructana que se produce particularmente en México. No obstante, la capacidad de diferentes cepas de bifidobacterias para metabolizar fructanas complejas de diversos orígenes, como la agavina y la levana, no ha sido extensamente estudiada. Es por ello que resulta interesante explorar y entender la especificidad de las cepas bifidobacterianas y de su maquinaria enzimática para aprovechar dichos sustratos y con el conocimiento generado sentar las bases para el desarrollo de estrategias de selección de bifidobacterias con potencial para la formulación de nuevos simbióticos.

4. JUSTIFICACIÓN

En México se comercializan muchos productos probióticos clasificados como suplementos o medicamentos elaborados a base de diversos microorganismos como lactobacilos y bifidobacterias, entre otros. De estos productos comerciales, pocos pueden ser considerados simbióticos (probiótico + prebiótico), puesto que la mayoría solo contiene cepas probióticas, y muy pocos tienen algún prebiótico como los FOS o la inulina. Asimismo, de acuerdo con los criterios descritos por la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos en 2020, ninguno de los simbióticos comerciales es un simbiótico sinérgico ya que no cuentan con estudios científicos que avalen que los microorganismos empleados, son capaces de utilizar selectivamente el prebiótico de la mezcla. En consecuencia, no se asegura la colonización, supervivencia y persistencia del probiótico suministrado y por ende, los efectos obtenidos más allá del tiempo en el que se administra el producto simbiótico. Así, la población mexicana escasamente cuenta con formulaciones simbióticas complementarias, pero no sinérgicas. Por lo tanto, el conocimiento de cómo enzimas específicas están involucradas en el metabolismo de prebióticos con estructuras bien caracterizadas contribuirá a desarrollar estrategias de selección de nuevas cepas que impulsen el desarrollo de verdaderas formulaciones simbióticas atractivas para la industria alimentaria y de la salud.

5. HIPÓTESIS

La actividad β -fructofuranosidasa extracelular de las bifidobacterias permite seleccionar cepas probióticas que utilicen agavina como fuente de carbono.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la actividad β -fructofuranosidasa extracelular en cepas de referencia para proponer un método de selección de nuevas cepas de bifidobacterias con potencial aplicación en el desarrollo de simbióticos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la actividad β -fructofuranosidasa extracelular de las cepas de referencia *B. adolescentis* ATCC® 15703™, *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ utilizando diversos sustratos prebióticos.
- Aislar, seleccionar e identificar bifidobacterias que consuman agavina como fuente de carbono a partir de heces de lactantes sanos.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cepas de referencia.

Las cepas *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™, *B. adolescentis* ATCC® 15703™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ fueron adquiridas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés). Las cepas fueron propagadas en 20 mL de medio líquido MRS estéril, pH 6.2, suplementado con 0.5 g/L de L-cisteína bajo condiciones anaerobias. El cultivo líquido fue burbujeado con dióxido de carbono (CO₂) a un flujo constante de 2 L/min. Los cultivos fueron incubados a 37 °C a 150 rpm durante 48 horas. Al finalizar las fermentaciones, se tomaron las muestras para medir el pH de los cultivos, con un potenciómetro Jenway 3510. También, se corroboró la morfología de los microorganismos por microscopía óptica, utilizando un frotis de cultivo teñido con la técnica de Gram como se describe en el apartado 7.2.

Parte de los cultivos fue conservado agregando glicerol a una concentración final de 40% y almacenándose a -30 °C. Cuando se requirió, las cepas fueron plaqueadas en medio MRS sólido con 0.5 g/L de L-cisteína para su uso posterior. El crecimiento de las placas se llevó a cabo en un desecador de vacío Bel-Art™, el cual fue adicionado con CO₂, durante 3 minutos a un flujo de 2 L/min y la incubación se realizó a temperatura ambiente y sin agitación.

7.2 Tinción de Gram.

En un portaobjetos limpio, se agregaron 10 uL de agua inyectable y 10 uL de la muestra de cultivo. Se homogeneizó con el asa bacteriológica. Cuando la muestra se

secó en el portaobjetos, se fijó mediante calor. Después, se realizó la tinción de Gram siguiendo las recomendaciones del proveedor. Primero, se adicionó el colorante cristal violeta durante 1 minuto. Inmediatamente, se enjuagó con agua destilada. Posteriormente, se agregó lugol durante 1 minuto. Seguidamente, se enjuagó y se añadió 3 gotas de una solución 1:1 de alcohol-acetona. Por último, se adicionó el colorante de safranina y se enjuagó hasta quitar el exceso.

7.3 Caracterización de la actividad β -fructofuranosidasa con las cepas de referencias

Las cepas de referencia *B. adolescentis* ATCC® 15703™, *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™, y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ fueron cultivadas en medio líquido, según lo descrito por [Cuevas-Juárez, Ávila-Fernández, & López-Munguía, en 2017](#) adicionando glucosa, fructosa, oligofructosa P95, agavina o inulina al 1% como fuente de carbono. El medio mínimo fue adicionado con amortiguador de fosfatos 100 mM y se ajustó el pH a 6.8. Posteriormente, fue esterilizado en un Autoclave Vitale Class CD 21 con los valores patrones del programa "Líquidos". Los carbohidratos y las sales se esterilizaron por filtración mediante una membrana mixta éster de celulosa (MCE) Advanted de 0.22 μ m. El medio se alicuotó en viales de 20 mL, los cuales fueron desgasificados con CO₂ bajo condiciones estériles.

Los medios de cultivo fueron incubados a 37 °C con agitación constante de 150 RPM. De igual forma, se tomaron muestras a lo largo de 24 h y la última a las 48 h para determinar el pH del cultivo, y el crecimiento microbiano.

La actividad β -FFasa extracelular de cada muestra se determinó en el medio de cultivo mediante geles de actividad en SDS-PAGE de poliacrilamida al 12% según lo descrito por Laemmli (1970) con algunas modificaciones. El gel fue adicionado con una solución de inulina al 1% (p/v). Posteriormente, se incubó en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0 durante 18 horas a 37 °C. La actividad enzimática se reveló cuando el gel se puso en contacto con el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich). La presencia de actividad se observó por la aparición de halos de claridad.

7.4 Esquema general de la metodología empleada para el aislamiento, selección e identificación de cepas bifidobacterianas.

La figura 1 esquematiza de forma global la metodología que se empleó para el aislamiento, selección e identificación de bifidobacterias con la habilidad de consumir fructanas de APM y estructura compleja como fuente de carbono a partir de heces de lactantes sanos.

Para el aislamiento de bifidobacterias, previa autorización y firma del consentimiento informado de los progenitores, se colectaron 6 muestras fecales de lactantes sanos que cumplieron los siguientes criterios de inclusión recabados en el interrogatorio indirecto:

1. Edad: lactantes de 6 meses a 2 años de edad.
2. Vía de nacimiento: vaginal.
3. Antecedente de edad gestacional de término.
4. Alimentación: antecedente de lactancia materna exclusiva durante 6 meses.
5. Estado de salud: sanos, clínicamente.

- a. Sin antecedente de enfermedades congénitas.
- b. Sin antecedente de enfermedades adquiridas en el mes anterior a la muestra.
- c. Sin antecedente de uso de medicamentos en el mes anterior a la muestra.
- d. Sin antecedente de hospitalizaciones.

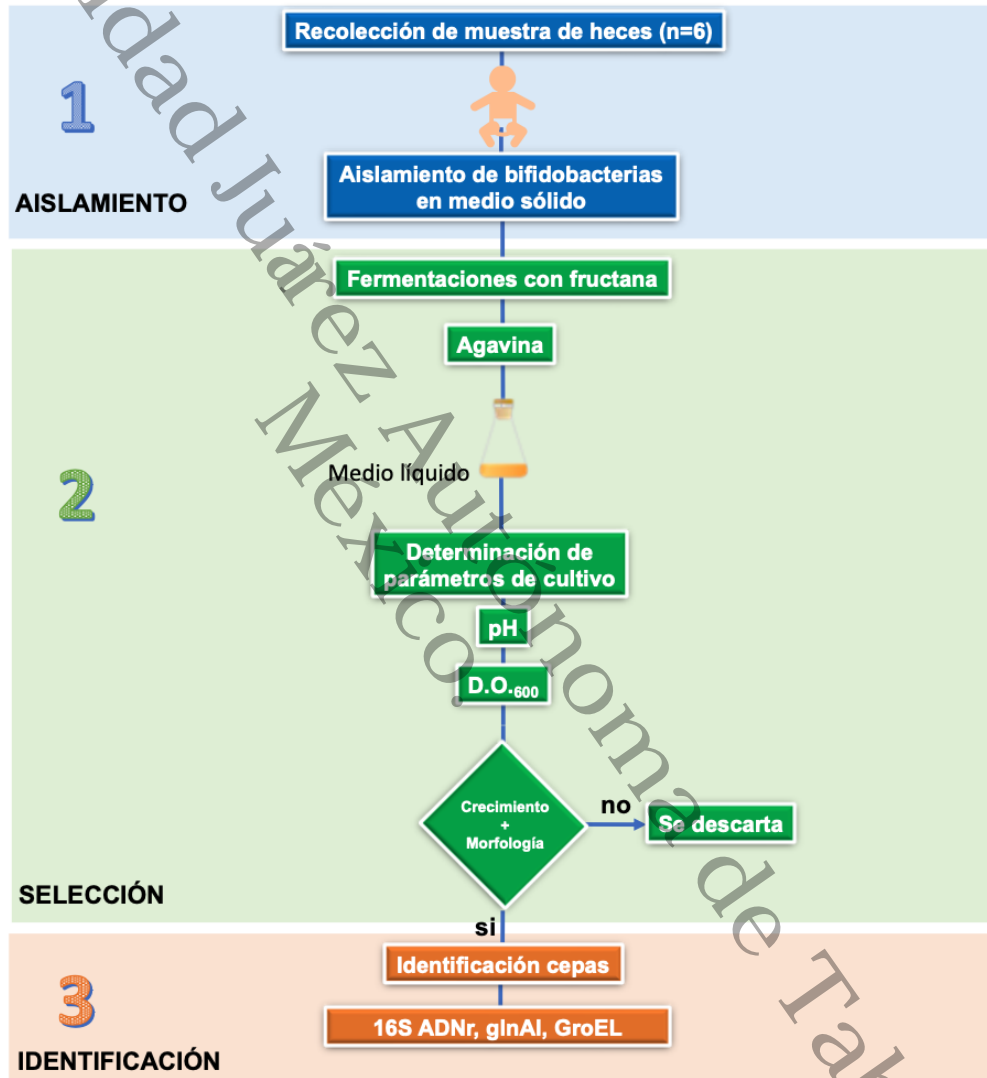


Figura 1. Representación esquemática del aislamiento, selección e identificación de cepas de bifidobacterias.

7.5 Aislamiento, selección e identificación de bifidobacterias a partir de lactantes

sanos.

Posteriormente, bajo condiciones asépticas, se tomó 1 g de las heces fecales y se diluyó en 9 mL de amortiguador de fosfatos, previamente desgasificado con CO₂. Luego, la solución de heces al 10% fue inoculada en medio mínimo suplementado con agavina como fuente de carbono, 50 µg/mL de Mupirocina y 0.5 g/L de L-cisteína, con el fin de propiciar el crecimiento bacteriano de las bifidobacterias presentes en las heces recolectadas de los 6 sujetos. En general, se inoculó 1 mL de la solución de las heces en viales estériles con 9 mL de medio mínimo previamente desgasificado con CO₂ y se realizaron diluciones seriadas hasta 1x10⁵, las cuales fueron incubadas a 37 °C, con agitación constante de 180 rpm, durante 96 horas.

Al finalizar el período de incubación, 1 mL de los cultivos fueron sembrados en medio sólido con agavina y fueron incubados durante 7 días a temperatura ambiente, sin agitación y bajo condiciones anaerobias. También, se conservó una muestra de los cultivos realizados en glicerol al 30% (1:1 v/v).

Una vez observado crecimiento en el medio sólido, se seleccionaron colonias al azar usando un asa estéril. Las colonias fueron inoculadas en viales estériles con medio líquido y se cultivaron bajo las condiciones previamente descritas. Se realizó tinción de Gram como se describe en la sección 7.2, y se verificó la morfología celular mediante microscopía óptica.

7.6 Extracción y cuantificación de ADN bacteriano.

A partir de las fermentaciones descritas en la sección 7.1 y 7.5, se tomó 1 mL de líquido a las 72 horas de crecimiento, y se centrifugó a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10,000 x g por 30 segundos y se removió completamente el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Para la extracción del ADN se utilizó el kit DNEasy PowerLyzer Microbial Kit (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La concentración de ADN fue determinada usando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™).

7.7 Identificación del género *Bifidobacterium* mediante PCR.

Con la finalidad de confirmar el género bacteriano de los microorganismos aislados de las heces de lactantes sanos, las cuales fueron identificadas como bifidobacterias debido a las características morfológicas que se observaron por microscopia óptica, se decidió hacer una identificación por ensayos de PCR al amplificar una secuencia parcial de los genes 16S ADNr, *glnAI* y *groEL* usando tres pares de oligonucleótidos específicos del género *Bifidobacterium* (Tabla 1). La mezcla de reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 uL, utilizando la polimerasa recombinante de *Thermus aquaticus* (Taq DNA Polimerase, Thermo Scientific). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador SelectCycler II SBT9610 (Select BioProducts) bajo las condiciones descritas por el proveedor de la enzima.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación del género Bifidobacterium.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Autor
g-BIF-F	5'd(CTCCTGGAAACGGGTGG)3'	Matsuki (2002)
g-BIF-R	5'd(GGTGTTCTTCCCGATATCTACA)3'	
gInAI-F	5'd(TTCCARGCCATCAACGARTC)3'	Killer (2020)
gInAI-R	5'd(GGASGARGMGTGCTYGATCA)3'	
groEL-F	5'd(TCCGATTACGAYCGYGAGAAGCT)3'	Hu (2017)
groEL-R	5'd(CSGCYTCGGTSGTCAGGAACAG)3'	

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Selección de cepas de referencia de bifidobacterias para la caracterización de la actividad β -FFasa extracelular.

Como se reportó anteriormente, [Morales-Contreras et al., en 2020](#), analizaron las secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas que pertenecen a la familia glicosil hidrolasa 32 (GH32), a partir de la información de los genomas de bifidobacterias depositados en la base de datos del NCBI y observaron que la mayoría de las cepas analizadas (63.7%) tienen solo un gen que codifica una proteína de la familia GH32. No obstante, reportaron que algunas cepas poseen más de un gen (36.2%) . Asimismo, las secuencias analizadas fueron agrupadas en tres grupos con base en la distancia genética, los cuales fueron denominados grupo 1, grupo 2 y grupo 3. Brevemente, en el grupo 1 (17.64%) se encuentran las secuencias de aminoácidos más cercanas al ancestro común más reciente. En cambio, en el grupo 2 (70.58%) se encuentran la mayoría de las secuencias de aminoácidos. Además, todos los genomas de bifidobacterias que fueron analizados contienen una secuencia de este grupo. Por último, en el grupo 3 (11.76%) están las secuencias de aminoácidos de mayor tamaño y son las secuencias que se encuentran más alejadas al ancestro común ([Morales-Contreras et al., 2020](#)).

Por otro lado, la mayoría de las β -FFasas hasta este momento caracterizadas pertenecen a cepas que poseen solo una β -FFasa, excepto por la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, que posee 2 β -FFasas, una de ellas clasificada en el grupo 3, reportada por [Ávila-Fernández, Cuevas-Juárez, Rodríguez-Alegría, Olvera, & López-](#)

Munguía, en 2016, y la otra en el grupo 2 caracterizada por Morales-Contreras & Ávila-Fernández, en 2018. Incluso, se constató que la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 fue capaz de crecer en medios suplementados con inulina y agavina, y en particular, la enzima asociada a la capacidad de esta cepa para metabolizar esos sustratos fue B.longum_I1, que pertenece al grupo 3 y tiene localización extracelular (Cuevas-Juárez, Ávila-Fernández, & López-Munguía, 2017).

Por consiguiente, para caracterizar la actividad β -FFasa extracelular y constatar que las enzimas del grupo 3 confieren a las bifidobacterias la habilidad de metabolizar fructanas de cadena larga y estructura compleja, se decidió emplear otra cepa con similares características a la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, es decir, que en su genoma posea una enzima del grupo 3 y una del grupo 2 de nuestra clasificación, la cepa *B. adolescentis* ATCC® 15703™. Asimismo, para corroborar nuestra hipótesis, incluimos en el estudio cepas de referencia que no poseen enzimas del grupo 3 como son: *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™, que posee una β -FFasa del grupo 2 y *B. catenulatum* ATCC® 27539™, que posee una β -FFasa del grupo 1 y otra del grupo 2.

Tabla 2. Secuencias de β -FFasas que poseen las cepas de referencia.

Especie	Cepa	beta-fructofuranosidasas		
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>B. longum</i>	ATCC 15697		X	X
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703**		X	X
<i>B. catenulatum</i>	ATCC 27539	X	X	
<i>B. animalis</i>	ATCC 25527		X	

8.2 Fermentaciones con cepas estándar de bifidobacterias utilizando fructanas como fuente de carbono.

Se analizó el crecimiento microbiano y el comportamiento del pH de las cepas *B. adolescentis* ATCC® 15703™, *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™, y *B. catenulatum* ATCC® 27539™, en medio mínimo suplementado con monosacáridos o fructanas para cada caso (Figuras 2, 3 y 4, respectivamente).

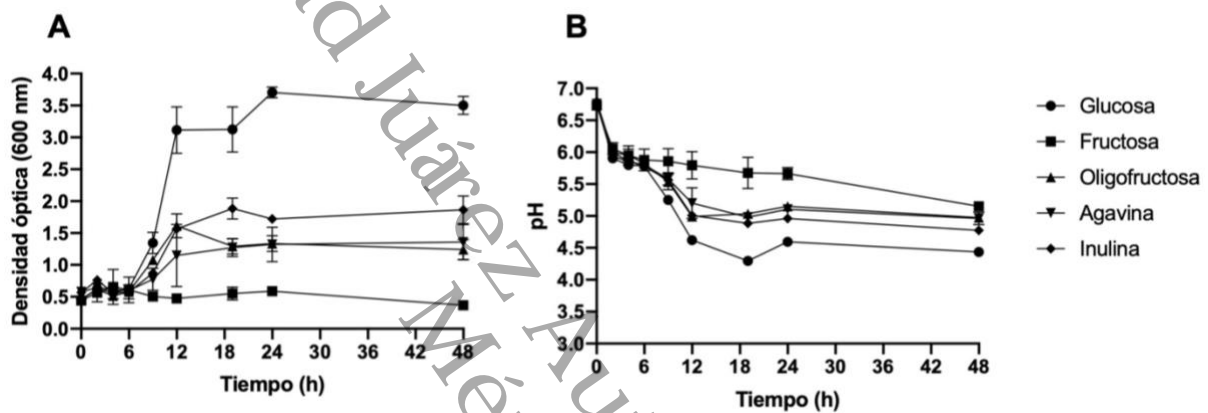


Figura 2. Evolución del crecimiento y pH en cultivos de *B. adolescentis* ATCC® 15703™ en medios suplementados con glucosa, fructosa, oligofructosa, agavina o inulina.

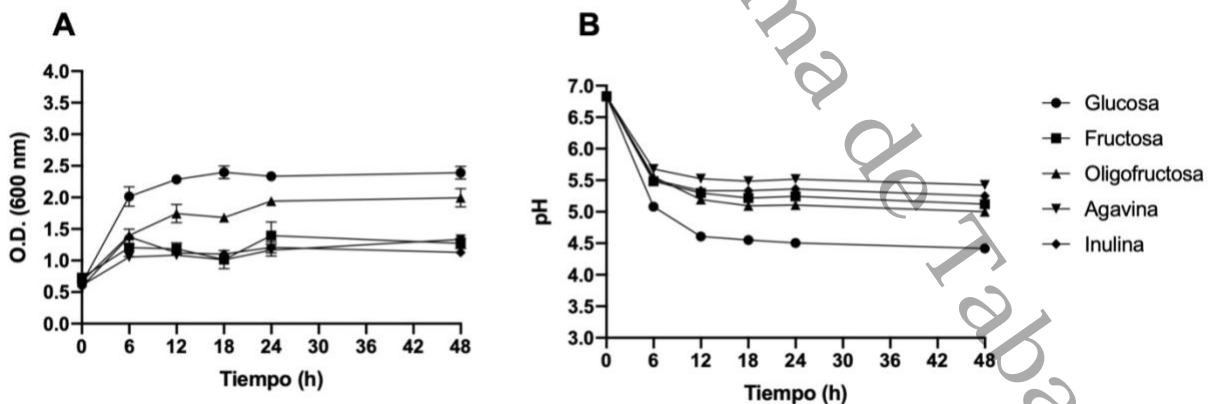


Figura 3. Evolución del crecimiento y pH en cultivos de *B. animalis subsp. animalis* ATCC® 25527™ en medios suplementados con glucosa, fructosa, oligofruktosa, agavina o inulina.

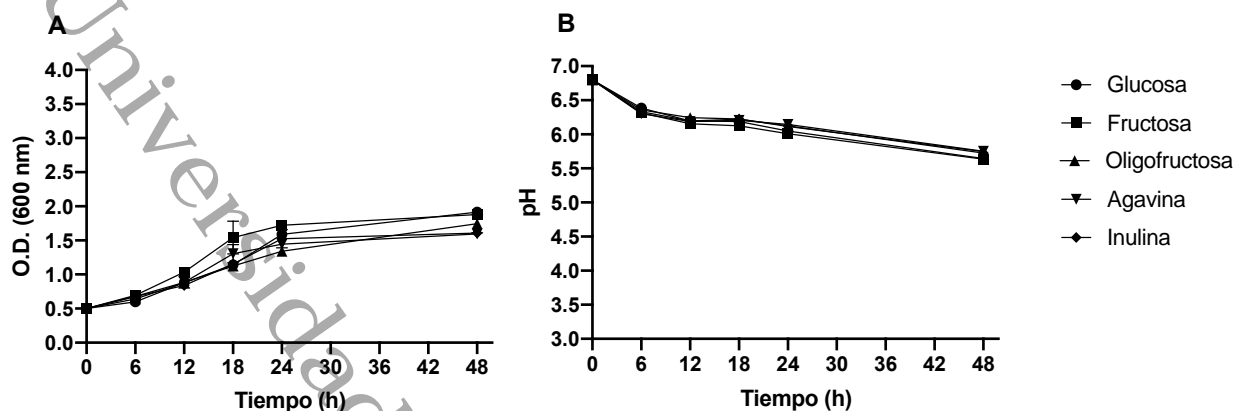


Figura 4. Evolución del crecimiento y pH en cultivos de *B. catenulatum* ATCC® 27539™ en medios suplementados con glucosa, fructosa, oligofruktosa, agavina o inulina.

Así pues, se constató que *B. adolescentis* ATCC® 15703™ fue capaz de utilizar todos los sustratos empleados, a excepción de la fructosa. El mayor crecimiento se observó entre las 18 y 24 horas en medio suplementado con glucosa. A partir de ese momento se observó la fase estacionaria del cultivo. Además, cuando el medio fue suplementado con fructanas, el mayor crecimiento de *B. adolescentis* ATCC® 15703™ fue en inulina, en comparación con los medios suplementados con agavina y oligofruktosa (Figura 2 A). Esto correlaciona muy bien con lo observado en la evolución del pH, donde el mayor descenso se registró cuando se utilizó glucosa como sustrato (pH 4.5), seguido de inulina, agavina y oligofruktosa (Figura 2 B). Así, a mayor crecimiento del cultivo, mayor acidificación del medio, la cual podría deberse a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son secretados al medio de cultivo. Estos resultados demuestran que la cepa *B. adolescentis* ATCC® 15703™ es

capaz de utilizar fructanas largas y complejas como fuente de carbono. En concreto, estos hallazgos son similares a lo reportado en trabajos para diferentes cepas de *B. adolescentis*. Por ejemplo, se reportó que la cepa *B. adolescentis* ATCC® 15703™ fue capaz de utilizar inulina (promedio ~ DP 25) y tres fracciones de fructanas de agave (AFF3 ~ DP 2–22; AFF2 ~ DP 2-40; y AFF1 ~ DP 3 -60) como fuente de carbono (Rossi et al., en 2005; Velázquez-Martínez et al., 2014), mientras que las cepas de *B. adolescentis*, ATCC 15700 y B/2, fueron capaces de crecer en medios con inulina (promedio ~ DP 23) (Selak et al., 2016; Rivière, Selak, Geirnaert, Van den Abbeele, & De Vuyst, 2018).

En relación con el cultivo de *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ se observó un mayor crecimiento sobre glucosa, seguido por oligofruktosa. En cambio, cuando los medios fueron suplementados con fructosa, agavina e inulina prácticamente no hubo cambios (Figura 3 A). Asimismo, la mayor acidificación del medio se produjo en el cultivo realizado con glucosa (pH 4.5) seguido por oligofruktosa (pH 5.0), mientras que, los cambios del pH en el resto de los cultivos fueron menores (Figura 3 B). El descenso de pH se detiene considerablemente a partir de las 12 h del cultivo y permanece casi constante hasta las 48 h tanto en la cepa *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ como en la cepa *B. adolescentis* ATCC® 15703™.

A diferencia de las cepas anteriores, *B. catenulatum* ATCC® 27539™ tuvo un crecimiento muy lento y de forma similar en todos los sustratos hasta las 48 h (Figura 3 A). La densidad óptica alcanzada por esta cepa fue alrededor de 1.5. De igual forma, el descenso del pH fue lento y mucho menor (pH 5.8) en comparación con los cultivos de

las cepas *B. adolescentis* ATCC® 15703TM y *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527TM (Figura 3 B).

Cabe mencionar que, no hay reportes previos del crecimiento de las cepas *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527TM y *B. catenulatum* ATCC® 27539TM en medios que contengan fructanas como fuente de carbono.

Si bien es cierto que en las fermentaciones sobre agavina e inulina con la cepa *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527TM la OD₆₀₀ aumenta de 0.5 a aproximadamente 1, al igual que en las fermentaciones sobre oligofruktosa, agavina e inulina con la cepa *B. catenulatum* ATCC® 27539TM donde la OD₆₀₀ aumenta de 0.5 a aproximadamente 1.5, este resulta ser un crecimiento aparente. El incremento de la OD₆₀₀ se explica porque los preinóculos de las cepas de referencia provenían de fermentaciones en el medio MRS, el cual contiene glucosa como fuente de carbono. Mientras que el preinóculo de *B. adolescentis* ATCC® 15703TM alcanzó una densidad óptica de 4.5 células/mL. Los preinóculos de *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527TM y *B. catenulatum* ATCC® 27539TM solo alcanzaron una densidad óptica de 3.13 y 2.42 células/mL, respectivamente. En consecuencia, para lograr una OD₆₀₀ inicial de 0.5 para cada cepa, fue necesario inocular con 1.09, 1.59 y 2.19 mL de preinóculo, respectivamente. Así, el volumen de preinóculo de la cepa *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527TM y *B. catenulatum* ATCC® 27539TM fue 1.5 y 2 veces mayor, respectivamente, al volumen de preinóculo de la cepa *B. adolescentis* ATCC® 15703TM. Por lo tanto, todos los cultivos de *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527TM y *B. catenulatum* ATCC® 27539TM contenían entre 0.0318 y 0.0438 g/L de glucosa al inicio del cultivo, lo que contribuyó al

crecimiento aparente de las cepas, que fue equivalente en los cultivos sobre agavina e inulina, en lugar de deberse a la capacidad de *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y de *B. catenulatum* ATCC® 27539™ para utilizar fructanas como fuente de carbono.

De igual manera, es importante destacar que *B. adolescentis* ATCC® 15703™, *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ fueron incapaces de crecer en el medio suplementado con fructosa. Algunos autores han reportado la incapacidad de fermentar algunos monosacáridos en algunas cepas de *B. lactis* y *B. animalis* DN-173-10 (Meulen, Avonts, & Vuyst, 2004; Trindade, Abratt, & Reid, 2003). Incluso, esta última cepa fue incapaz de utilizar otros monosacáridos como glucosa, fructosa y galactosa (Meulen et al., 2004). En contraste, se ha reportado que la tasa máxima de crecimiento específico de la cepa *B. adolescentis* MB239 ocurrió en los medios suplementados con glucosa y fructosa (Amaretti et al., 2006). Estas características de crecimiento podrían ser específicas de cada cepa y los autores sugieren que se debe a la presencia o ausencia de diferentes transportadores específicos para estos monosacáridos.

8.3 Análisis de la actividad β -FFasa extracelular en geles de actividad enzimática.

Además, para demostrar la presencia de la actividad β -FFasa extracelular de *B. adolescentis* ATCC® 15703™, se realizó la determinación de la actividad enzimática en forma cualitativa mediante geles de actividad enzimática (Figura 5). Después de 18 h de reacción se observó actividad β -FFasa extracelular solo en los sobrenadantes de las fermentaciones de *B. adolescentis* ATCC® 15703™ sobre oligofructosa, agavina e inulina

(Figura 5B), a diferencia de las fermentaciones realizadas sobre glucosa y fructosa. Cabe mencionar que, no se detectó la presencia de la actividad β -FFasa extracelular en ninguno de los sobrenadantes de los cultivos de *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ sobre ninguno de los sustratos (imagen no mostrada).

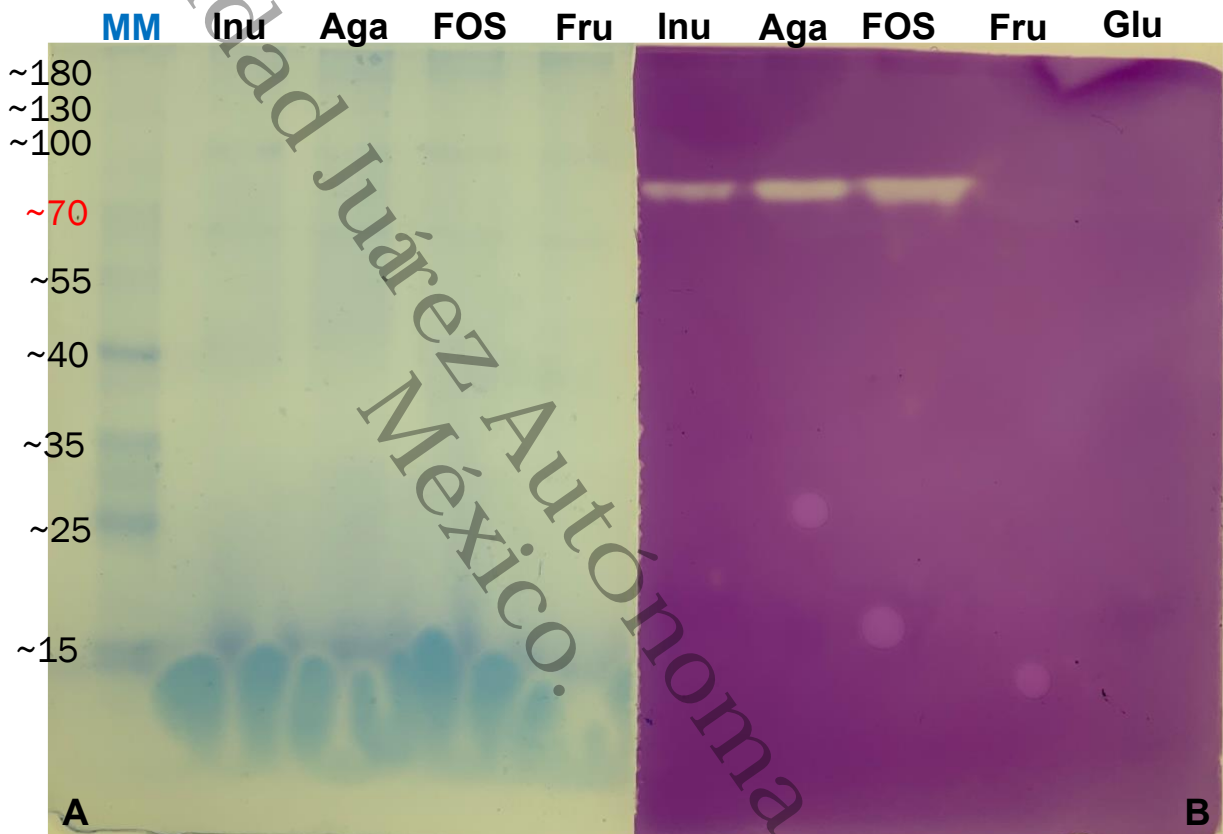


Figura 5. Gel de actividad al 12% suplementado con inulina de *Leuconostoc citreum* al 1%, empleando las fermentaciones de *B. adolescentis* ATCC® 15703™ en glucosa (Glu), fructosa (Fru), oligofruktosa (FOS), agavina (Aga), inulina (Inu). Marcador molecular (MM). Teñido con Code Blue Stain (A) y reactivo de Schiff (B).

Estos resultados sugieren que la oligofruktosa, la agavina y la inulina inducen la actividad β -FFasa extracelular en *B. adolescentis* ATCC® 15703™, a diferencia de los

monosacáridos glucosa y fructosa. Previamente, se reportó la presencia de la actividad β -FFasa extracelular en ensayos de actividad enzimática para la cepa *B. adolescentis* MB239, pero no en geles de actividad. En este estudio se cuantificó una mayor actividad enzimática en presencia de glucosa en comparación de la fructosa u oligofructosa (Amaretti et al., 2006). No obstante, los autores no mencionan alguna explicación para este fenómeno. Cabe destacar que no en todos los casos se ha cuantificado la actividad β -FFasa utilizando el mismo sustrato. Por ejemplo, Amaretti et al., (2006) emplea sacarosa, mientras que otros autores emplean oligofructosa como sustrato para las reacciones de actividad enzimática (Perrin, Grill, & Schneider, 2000). Esto hace que nuestros resultados no sean comparables con los de otros estudios y se requiere que los estudios se realicen en forma sistemática con diferentes cepas utilizando los mismos sustratos para poder comparar las enzimas.

Por otra parte, la ausencia de la actividad β -FFasa extracelular en los medios de cultivo de la cepa *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ podría deberse a que ninguna de estas dos cepas poseen una enzima homóloga a *B. longum*_I1 y por ello son incapaces de metabolizar agavina e inulina.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que la cepa *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™, son incapaces de utilizar fructanas largas y de estructura compleja como fuente de carbono. Asimismo, la ausencia del crecimiento y la actividad β -FFasa extracelular en los medios de cultivo que contienen fructanas como la inulina o la agavina en el caso de las cepas *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ apoyan la hipótesis de que las

bifidobacterias que posean en su genoma una enzima homóloga a *B. longum*_11 (grupo 3) como es el caso de *B. adolescentis* ATCC® 15703™ serán capaces de metabolizar fructanas de cadena larga y de estructura compleja (Morales-Contreras et al., 2020). Y dado que *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ posee una enzima del grupo 2 y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ una enzima del grupo 1 y 2, son incapaces de metabolizar agavina e inulina.

8.4 Estrategia de selección de cepas de bifidobacterias.

Con el comportamiento observado en los cultivos de las cepas de referencia se establecieron ciertas condiciones y parámetros que servirán como estrategia para discriminar entre diferentes cepas de bifidobacterias, aquellas que metabolicen fructanas largas y de estructura compleja, debido a la presencia de actividad β -FFasa extracelular. Así, en un cultivo con una OD₆₀₀ inicial de 0.5 a un pH de 6.8 suplementado con una concentración de 5 g/L de oligofructosa, agavina o inulina, analizado a las 18 h de cultivo, se espera un decremento de pH por debajo de 5 y un aumento en el crecimiento de cuando menos 1 OD₆₀₀ sobre al menos 2 de las 3 fructanas empleadas, como indicadores de que la cepa es capaz de metabolizarlas. Aquellas cepas con el mayor crecimiento y en consecuencia el mayor descenso del pH, serán consideradas como candidatas para posteriores estudios de sus capacidades probióticas.

Estas condiciones fueron establecidas con base en los resultados de los cultivos de las cepas de referencia, ya que, a partir de las 18 horas, el crecimiento es máximo y poco variable en los cultivos de cepas que pueden metabolizar fructanas. Asimismo, el descenso del pH alcanza valores por debajo de 5, alrededor de las 18 horas y a partir

de ese momento es poco variable, dado que correlaciona con el incremento en la densidad óptica. Por último, las cepas que metabolizan fructanas largas y de estructura compleja también metabolizan oligofruktosa, pero no todas las que metabolizan oligofruktosa metabolizan inulina o agavina, es por ello que se requiere que la cepa se desarrolle al menos en 2 de las 3 fructanas empleadas para ser seleccionadas para su identificación y estudios posteriores.

8.5 Aislamiento, selección y crecimiento de bifidobacterias a partir de heces de lactantes sanos.

8.4.1 Preselección y enriquecimiento en medio líquido.

Para el desarrollo del segundo objetivo "Aislar, seleccionar e identificar bifidobacterias que consuman agavina como fuente de carbono a partir de heces de lactantes sanos", se decidió emplear el medio de cultivo mínimo adicionado con agavina, descrito previamente para la caracterización de la actividad β -FFasa de las cepas de referencia. Puesto que, como sabemos, son pocos géneros de bacterias, entre ellas, algunas bifidobacterias los que pueden aprovechar a la agavina como fuente de carbono, decidimos utilizar esta fructana para hacer más selectivo el medio de cultivo y propiciar el crecimiento de las bifidobacterias con un tipo particular de β -Ffasa que nos asegure que las cepas seleccionadas son capaces de metabolizar fructanas de estructura compleja.

Así pues, se colectaron 6 muestras de heces fecales de lactantes sanos que cumplieron con los criterios establecidos en el apartado 6.2, previa autorización y firma

del consentimiento informado por parte de los progenitores. El 83% de los donadores fueron del sexo femenino (Figura 6). Inicialmente, se había propuesto realizar un agrupamiento con el número total de muestras (6). No obstante, debido a que las evacuaciones fueron colectadas en diferentes horarios y la recomendación de la técnica de aislamiento de bifidobacterias a partir de heces sugiere procesar las muestras dentro de las primeras horas, el número de muestras en cada agrupamiento se redujo a dos (Figura 8).

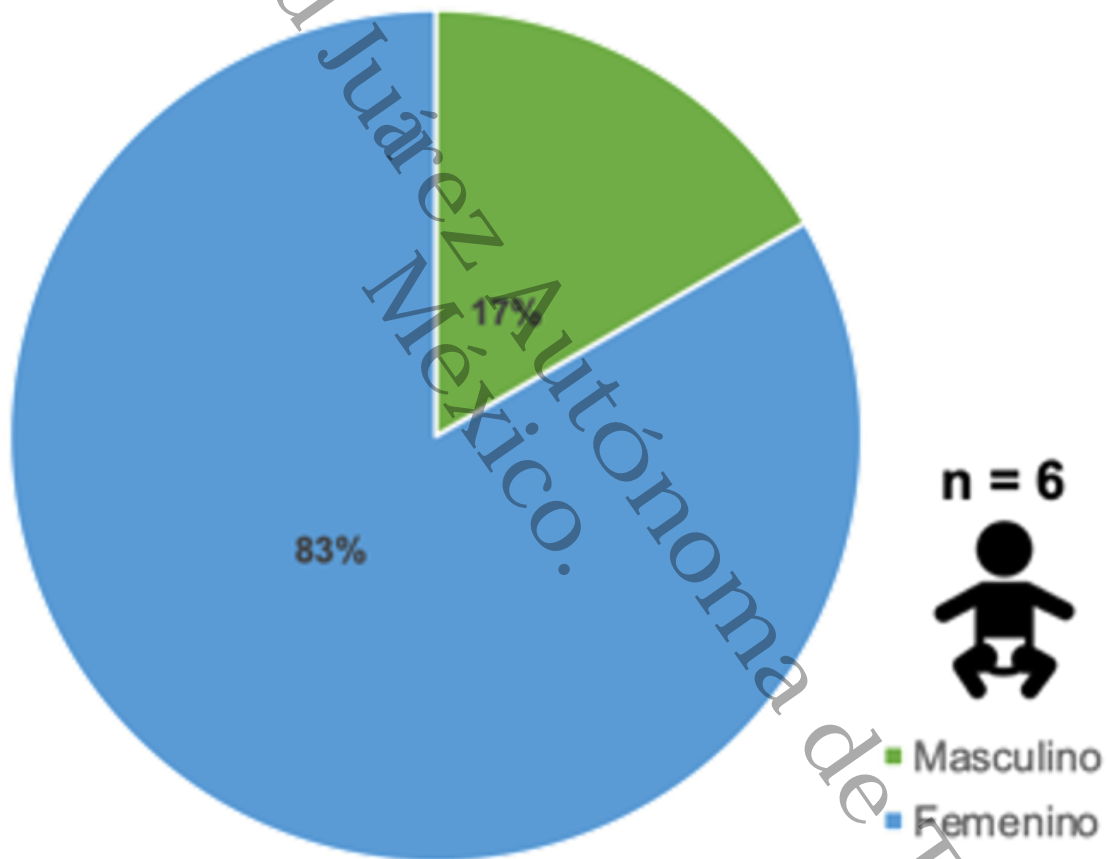


Figura 6. Sexo de los lactantes sanos que donaron sus heces fecales.

En general, los resultados con los 3 agrupamientos fueron los siguientes: a mayor dilución mayor hay un menor crecimiento bacteriano con un similar decremento del pH del medio de cultivo (Figura 7).

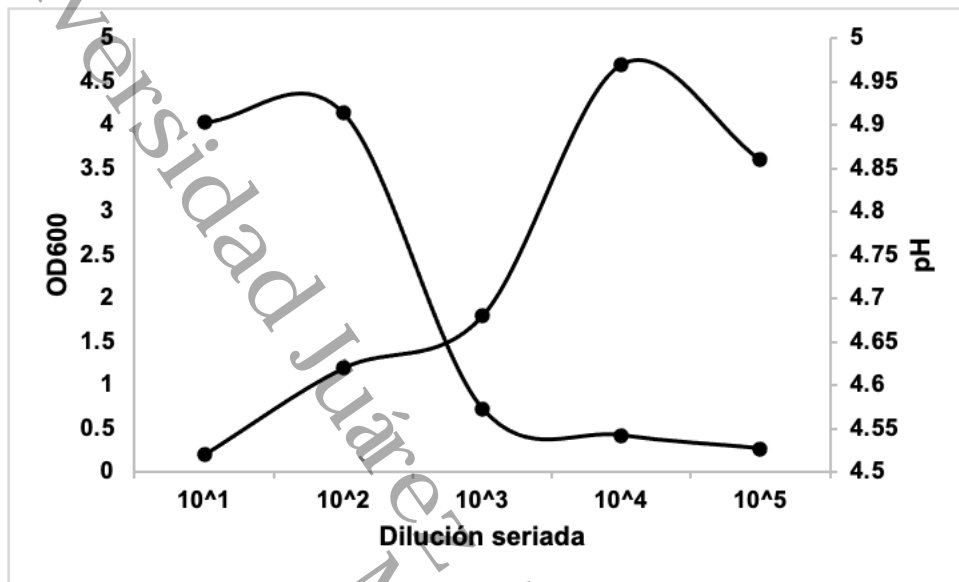


Figura 7 Crecimiento bacteriano y descenso del pH de las diluciones seriadas a partir de las heces de lactantes sanos cultivadas en medio mínimo suplementado con agavina durante 48 h.

En los 3 agrupamientos se visualizó el predominio de la morfología celular de bacilos pleomórficos en forma de “V” y “Y”, característicos de las bifidobacterias. Aunque, predominantemente en la figura 8B se observa que estos microorganismos son aparentemente bacterias Gram (-), la morfología es indiscutiblemente bifida. Hay que recordar que la coloración de las bacterias mediante la tinción de Gram depende de diversos factores. Por ejemplo, una bacteria Gram (+) puede teñirse como Gram (-) debido a la pérdida de la integridad de la pared celular o al aumentar la acidez. En particular, las bifidobacterias se encontraban en un medio ácido.

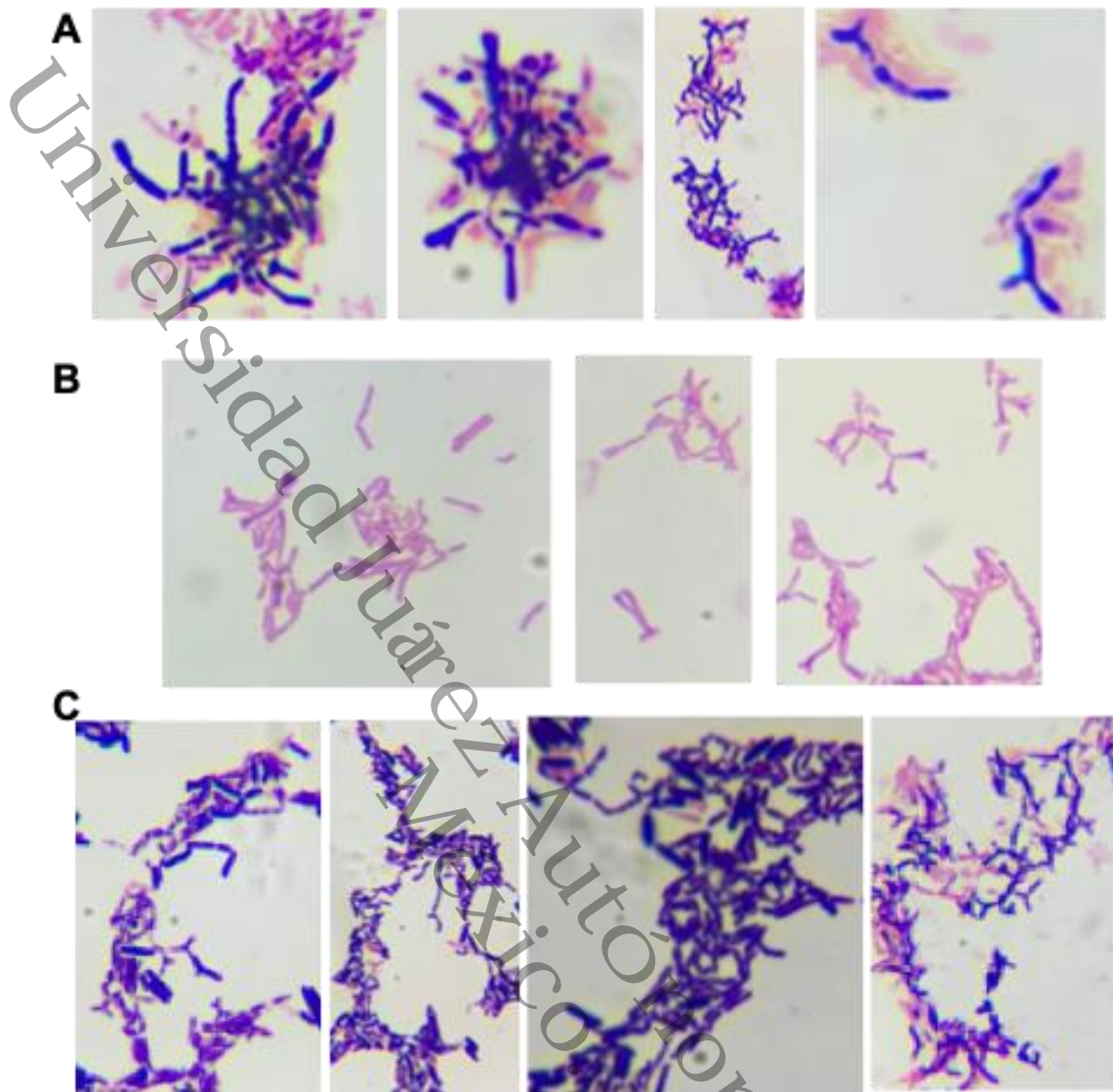


Figura 8. Microfotografía de la tinción de gram de los cultivos líquidos en medio mínimo modificado. A: Agrupamiento 1 (sujeto 1 y 2), B: Agrupamiento 2 (sujeto 3 y 4), C: Agrupamiento 3 (sujeto 5 y 6).

8.4.2 Aislamiento de colonias en medio sólido.

Posteriormente, los agrupamientos enriquecidos en medio líquido fueron sembrados en viales con medio mínimo modificado y sólido. En la Figura 9 se observa la morfología

de los bacilos Gram (+) que conforman las diferentes colonias aisladas. La mayoría de los aislados muestra un comportamiento en empalizada similar a *B. adolescentis* ATCC® 15703™. No obstante, no se visualiza la morfología en “Y”. En algunas ocasiones se observaron la morfología en “V” (aislados 5, 6, 8 y 9). Incluso, los aislados 10 y 11 tienen la forma en palo de golf, típica del filo de las Actinobacterias, similar a la morfología de *B. catenulatum* ATCC® 27539™. Por lo tanto, es posible que estos microorganismos si estén relacionados con el género *Bifidobacterium* debido a las similitudes observadas en su morfología con las cepas de referencia.

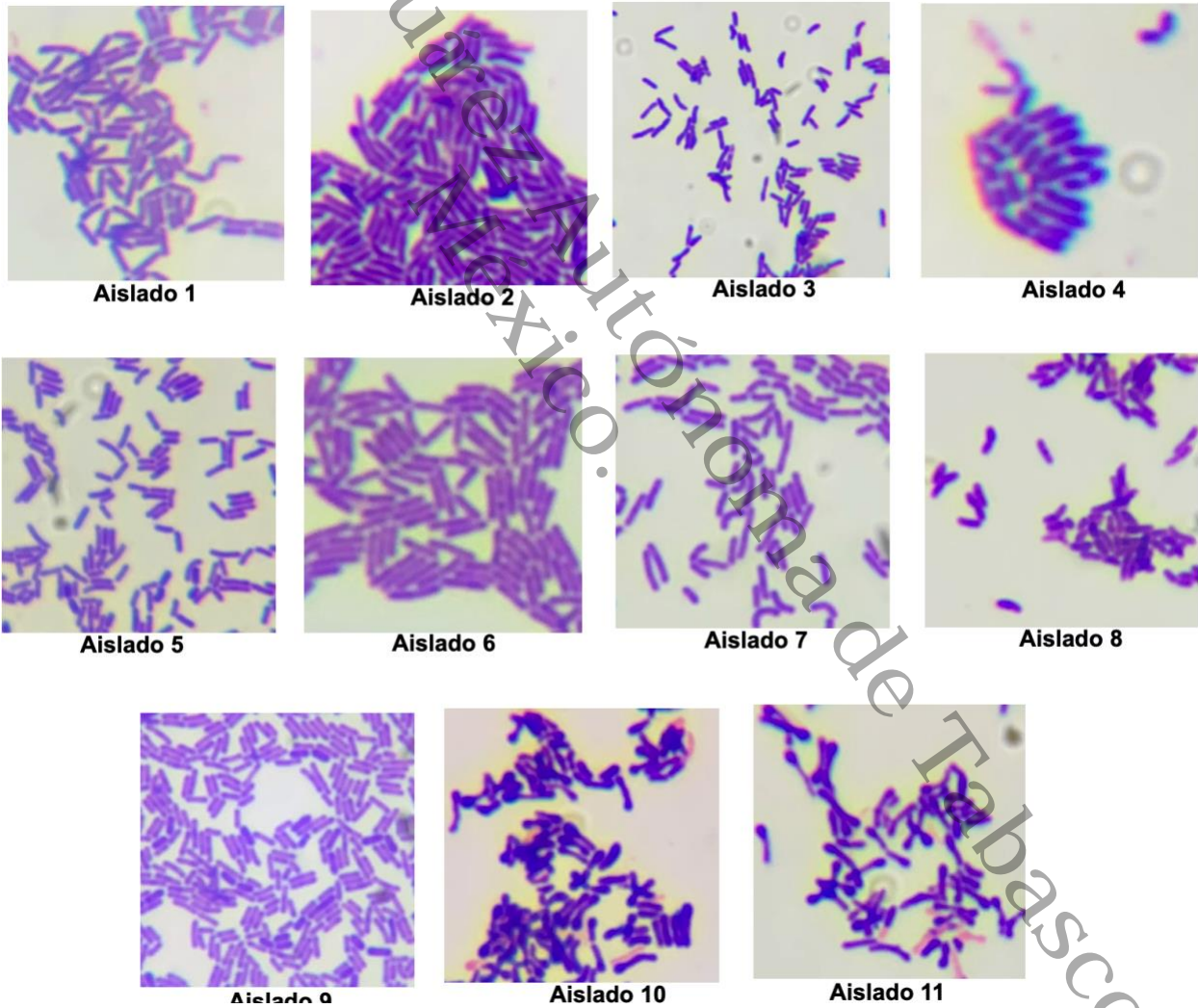


Figura 9. Microfotografías de las bacterias aisladas en el medio mínimo modificado y sólido, teñidas mediante la técnica de Gram.

8.6 Identificación del género mediante PCR.

Para corroborar que los microorganismos aislados pertenecen al género *Bifidobacterium* se sintetizaron 3 pares de oligonucleótidos, con base en los genes 16S ADNr, Glutamina sintetasa tipo I (glnAI), y GroEL, que amplifican un fragmento de aproximadamente 500, 700 y 500 pb, respectivamente. El gen 16S ADNr se ha utilizado ampliamente como una herramienta valiosa para la identificación bacteriana de bifidobacterias (Matsuki et al., 2002). Sin embargo, algunos autores refieren ciertas limitantes al emplear este marcador. Por lo tanto, se han explorado y reportado otros genes alternativos para la identificación, la genotipificación y el análisis filogenético en aislados de bifidobacterias. En este trabajo empleamos dos genes adicionales al 16S ADNr para la identificación de bifidobacterias, glnAI y GroEL. El primer gen participa en la condensación dependiente de ATP de glutamato y amoníaco (especialmente producidos por la reducción de nitrato y la degradación de aminoácidos) para formar glutamina (Killer et al., 2020). Mientras que, GroEL codifica la chaperonina GroEL (los sinónimos son Cpn60, GroL, Hsp60 y MopA), que desempeña un papel esencial en el manejo del estrés celular (Junick & Blaut, 2012). Ambos, han sido reportados previamente como excelentes marcadores moleculares para la identificación de especies de bifidobacterias (Hu et al., 2017; Killer et al., 2020). Cabe mencionar, que los tres pares de oligonucleótidos empleados han sido anteriormente probados en diferentes cepas de bifidobacterias. No obstante, ninguno de ellos reporta un porcentaje de sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, los oligonucleótidos para el marcador glnAI fueron probados

con diferentes cepas pertenecientes a 32 especies de bifidobacterias. En cambio, los oligonucleótidos para el marcador groEL fueron probados con 40 especies diferentes de bifidobacterias, dentro de las que se encuentran *B. adolescentis* y *B. animalis* las cuales fueron utilizadas como cepas de referencia para este trabajo. Por lo anterior, con los 3 marcadores moleculares seleccionados esperamos poder identificar alrededor de 41 especies diferentes de bifidobacterias. No obstante, se sabe que existen más de 72 especies actualmente reportadas. En consecuencia, existe la posibilidad que las especies restantes, que no fueron probadas en los estudios descritos e incluso nuevas especies de bifidobacterias, no sean identificadas con estos marcadores moleculares.

A continuación se muestran los resultados del gradiente de temperatura de alineamiento para la PCR con los 3 pares de oligonucleótidos del 16S ADNr, glnAI, y groEL, empleando el ADN genómico de *B. adolescentis* ATCC® 15703™ como molde. Se observó la amplificación de tres fragmentos de 500, 750 y 500 pb, que corresponden al tamaño esperado para la amplificación de los genes 16S ADNr, glnAI y GroEL, respectivamente (Figura 10).

Para la identificación de los microorganismos aislados se seleccionó una temperatura de alineamiento de 58 °C para el gen 16S ADNr y de 55 °C para los genes glnAI y GroEL, de acuerdo con el resultado mostrado en la figura 10, donde se observa encerrado en amarillo el fragmento con mejor amplificación.

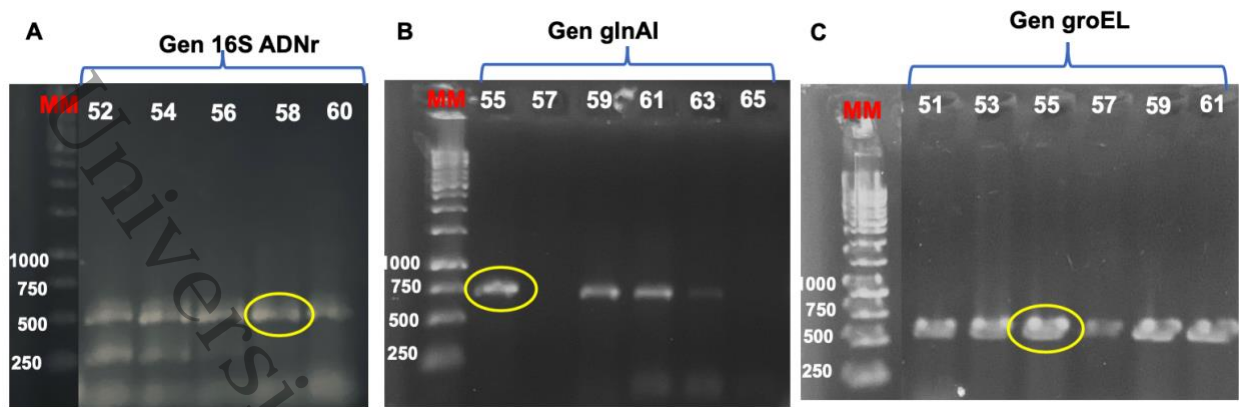


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro etidio. Gradiente de temperatura de alineamiento para la amplificación del gen 16S ADNr (A), glnAI (B) y groEL (C), Marcador Molecular (MM).

Al amplificar los genes 16S ADNr y glnAI para identificar el género *Bifidobacterium* en los aislados se obtuvieron fragmentos de los tamaños esperados, cuando se empleó como molde el ADN genómico de los aislados 2 y 3 (Figura 11A y 11B). Con respecto, a la amplificación del fragmento del gen GroEL se observaron bandas de aproximadamente 500 pb al utilizar el ADN genómico de los aislados 2, 7, 10 y 11 (Figura 11C). Por lo que no se descarta la posibilidad de que los aislados 2, 7, 10 y 11 sean bifidobacterias. Sin embargo, se requiere secuenciar los fragmentos para verificarlo.

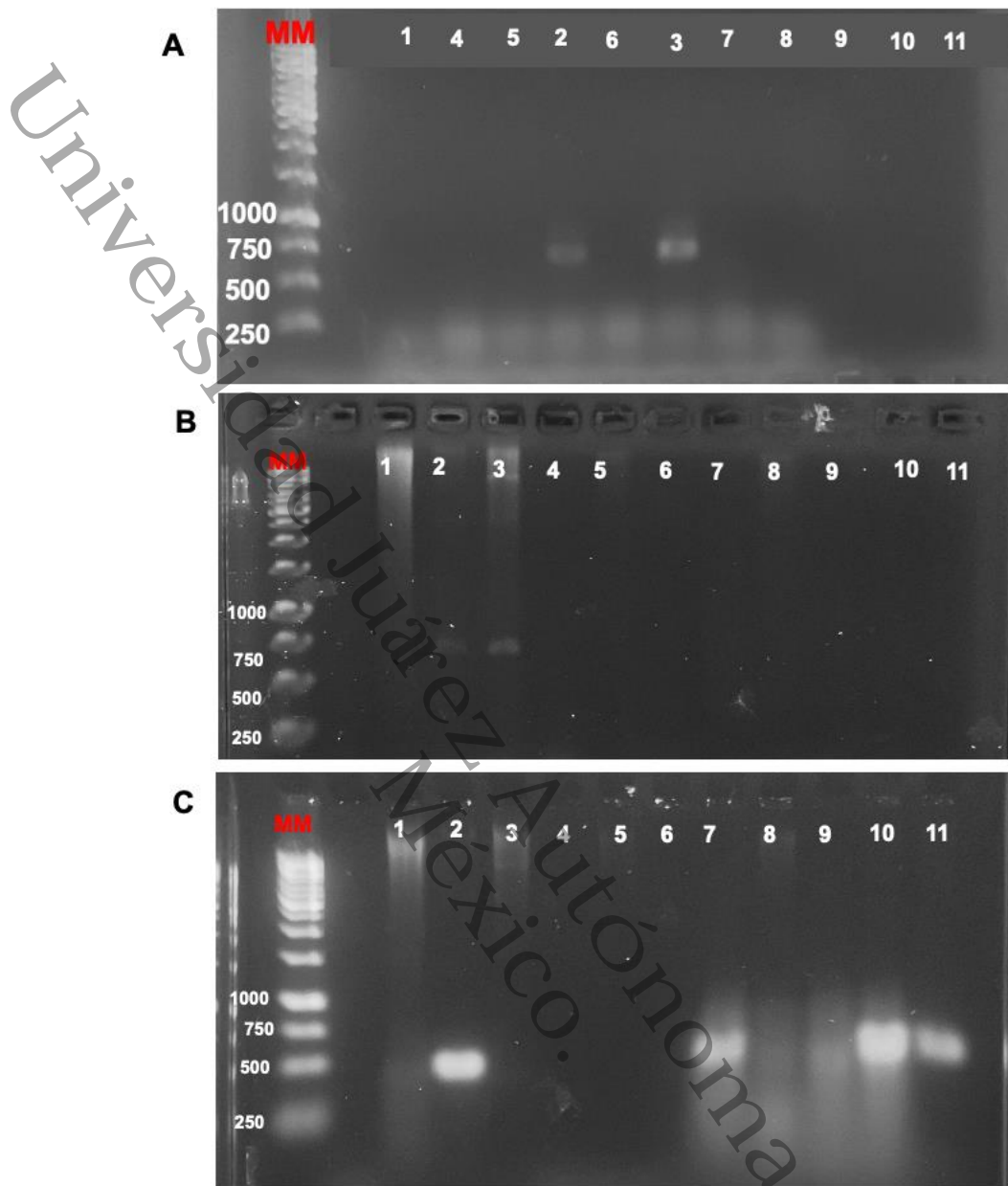


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro etidio. Amplificación de los genes 16S ADNr (A), glnAI (B) y groEL (C) a partir del ADNg de los aislados. Marcador Molecular (MM).

De las 11 cepas aisladas capaces de crecer en el medio mínimo modificado, 5 aislados han sido identificados como miembros del género *Bifidobacterium* (Tabla 3),

debido a la amplificación de al menos uno de los tres genes empleados (16S rDNA, glnAI y groEL). Sin embargo, se requiere la secuenciación de los fragmentos de PCR para corroborarlo y la secuenciación del genoma completo para identificar si se trata de nuevas cepas diferentes a las reportadas en la base de datos.

Por otra parte, aunque el resto de los aislados (1, 4, 5, 6, 8 y 9) podrían no ser bifidobacterias de acuerdo a los marcadores moleculares empleados, su similitud morfológica con los aislados 4, 6 y 12 y a *B. adolescentis* ATCC® 15703™ (Figura 9) hace suponer que los marcadores o los oligonucleótidos empleados podrían no ser específicos para la identificación de nuevas cepas del género *Bifidobacterium*. Puesto que, como observamos en la tabla 3, de los aislados 7, 10 y 11, donde hay una amplificación del gen GroEL, no hay una amplificación de los genes 16S ADNr y glnAI.

Tabla 3. Aislados identificados como bifidobacterias de acuerdo a los marcadores moleculares 16S ADNr, glnAI y groEL.

Aislado	16S rDNA	glnAI	groEL
2	✓	✓	✓
3	✓	✓	✗
7	✗	✗	✓
10	✗	✗	✓
11	✗	✗	✓

Diversos autores manifiestan que existen ciertas limitaciones al confiar en un único gen, tal es el caso del gen 16S ADNr, como marcador genético para la clasificación

bacteriana. La secuenciación de los fragmentos amplificados y del genoma completo de las cepas aisladas proporcionarán datos taxonómicos concluyentes. El incremento en la información de genomas de más cepas de bifidobacterias permitirá un análisis filogenómico más exhaustivo que proporcione mejores herramientas para la clasificación de nuevas cepas de este género (B. J. Kim, Kim, Yun, Kim, & Kook, 2010; Lee & O'Sullivan, 2010).

9. CONCLUSIONES

1. La cepa de referencia *B. adolescentis* ATCC® 15703™, a diferencia de *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™, aprovecha las fructanas largas y complejas como fuente de carbono.
2. El crecimiento de la cepa *B. adolescentis* ATCC® 15703™ utilizando agavina e inulina como fuente de carbono parece estar asociado a la presencia de enzimas extracelulares del grupo 3.
3. El crecimiento de cepas de bifidobacterias y el descenso del pH analizados a las 18 horas de cultivo sobre diferentes fructanas permite determinar la presencia de la actividad β -fructofuranosidasa extracelular en las cepas.
4. El medio mínimo suplementado con agavina diseñado en este estudio permite aislar cepas con morfología de bifidobacteria a partir de heces de lactantes sanos.
5. La identificación preliminar de las cepas mediante la amplificación de los genes 16S ADNr, *glnAI* y *groEL* indica que ninguno de ellos es un marcador universal para este género.

10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el crecimiento de las cepas de referencia *B. adolescentis* ATCC® 15703™, *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC® 25527™ y *B. catenulatum* ATCC® 27539™ sobre otro tipo de fructana como la levana.
2. Secuenciar los fragmentos de PCR para determinar la especificidad de los oligonucleótidos empleados y el genoma completo de los microorganismos aislados para determinar si se trata de nuevas cepas.
3. Secuenciar las enzimas secretadas por los microorganismos aislados para determinar a qué grupo filogenético pertenecen.
4. Evaluar en las cepas aisladas, la presencia de actividad β -fructofuranosidasa extracelular y su capacidad de metabolizar fructanas complejas utilizando las condiciones establecidas con las cepas de referencia.

11. REFERENCIAS

- Ackerman, D. L., Craft, K. M., & Townsend, S. D. (2017). Infant Food Applications of Complex Carbohydrates: Structure, Synthesis, and Function. *Carbohydr Res.*, 437, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.11.007>.
- Amaretti, A., Tamburini, E., Bernardi, T., Pompei, A., Zanoni, S., Vaccari, G., ... Rossi, M. (2006). Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: Compared growth on single and mixed carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 654–662. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0500-9>
- Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2016). Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204>
- Ávila-Fernández, Cuevas-Juárez, E., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2016). Functional characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on structurally diverse fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 263–276. <https://doi.org/10.1111/jam.13154>
- Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzyna, I., & Bujacz, G. (2011). Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *FEBS Journal*, 278(10), 1728–1744. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08098.x>
- Cuevas-Juárez, E., Ávila-Fernández, Á., & López-Munguía, A. (2017).

- Identification of enzymatic activities involved in agave fructan consumption by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. *Journal of Functional Foods*, 35, 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.048>
- Di Bartolomeo, F., & Van den Ende, W. (2015). Fructose and Fructans: Opposite Effects on Health? *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 227–237. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0485-6>
- Gibson, G. R., Hutkins, R. W., & Prescott, S. L. (2017). *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics*.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hu, L., Lu, W., Wang, L., Pan, M., Zhang, H., Zhao, J., & Chen, W. (2017). Assessment of *Bifidobacterium* species using groEL gene on the basis of illumina miseq high-throughput sequencing. *Genes*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/genes8110336>
- Junick, J., & Blaut, M. (2012). Quantification of human fecal *Bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the groEL gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2613–2622. <https://doi.org/10.1128/AEM.07749-11>

- Killer, J., Mekadim, C., Bunešová, V., Mrázek, J., Hroncová, Z., & Vlková, E. (2020). Glutamine synthetase type I (glnAI) represents a rewarding molecular marker in the classification of bifidobacteria and related genera. *Folia Microbiologica*, 65(1), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00716-0>
- Kim, B. J., Kim, H. Y., Yun, Y. J., Kim, B. J., & Kook, Y. H. (2010). Differentiation of Bifidobacterium species using partial RNA polymerase β -subunit (rpoB) gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2697–2704. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020339-0>
- Kim, J. H., An, H. J., Garrido, D., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2013). Proteomic Analysis of Bifidobacterium longum subsp. infantis Reveals the Metabolic Insight on Consumption of Prebiotics and Host Glycans. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057535>
- Kuo, S.-M. (2017). Does Modification of the Large Intestinal Microbiome Contribute to the Anti-inflammatory Activity of Fermentable Fiber? *Current Developments in Nutrition*, cdn.117.001180. <https://doi.org/10.3945/cdn.117.001180>
- Lam, K. L., & Cheung, P. C. K. (2019). Carbohydrate-Based Prebiotics in Targeted Modulation of Gut Microbiome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04811>
- Lee, J.-H., & O'Sullivan, D. J. (2010). Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 378–416. <https://doi.org/10.1128/mubr.00004-10>
- Liu, X., Cao, S., & Zhang, X. (2015). Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

63(36), 7885–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02404>

Lugli, G. A., Mancino, W., Milani, C., Duranti, S., Mancabelli, L., Napoli, S., ...

Turrone, F. (2019). Dissecting the evolutionary development of the species *bifidobacterium animalis* through comparative genomics analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(7), 1–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02806-18>

Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>

Mart, E., Barrera-dur, C., Gonz, M., & Hern, E. (2016). *Efecto de simvastatina más inulina en comparación con simvastatina más ezetimiba en el tratamiento de la dislipidemia mixta.*

Marx, S. P., Winkler, S., & Hartmeier, W. (2000). Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 163–169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612749>

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., ... Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5445–5451. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5445-5451.2002>

Meulen, R. Van Der, Avonts, L., & Vuyst, L. De. (2004). Short Fractions of Oligofructose Are Preferentially Metabolized by. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1923–1930. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1923>

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., ... Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 81(4), e00036-17.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Ferrario, C., ... Ventura, M. (2016). Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 980–991.

<https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>

Morales-Contreras, J. A., & Ávila-Fernández, Á. (2018). *Caracterización bioquímica de la beta-fructofuranosidasa 2 de Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 y su análisis comparativo.*

Morales-Contreras, J. A., Ávila-Fernández, Á., & Melgar-Valdes, C. E. (2020). *Estudio comparativo de las 2 B-fructofuranosidasas recombinantes de Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703.* Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Öner, E. T., Hernández, L., & Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 34(5), 827–844. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>

Padilla-Camberos, E., Barragán-Álvarez, C. P., Diaz-Martinez, N. E., Rathod, V., & Flores-Fernández, J. M. (2018). Effects of Agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. azul) on Body Fat and Serum Lipids in Obesity. *Plant Foods for*

- Human Nutrition*, 73(1), 34–39. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0654-5>
- Perrin, S., Grill, J. P., & Schneider, F. (2000). Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 88(6), 968–974. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01070.x>
- Rivière, A., Selak, M., Geirnaert, A., Van den Abbeele, P., & De Vuyst, L. (2018). Complementary mechanisms for degradation of inulin-type fructans and arabinoxylan oligosaccharides among bifidobacterial strains suggest bacterial cooperation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), 1–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02893-17>
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., & Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6150–6158. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6150-6158.2005>
- Selak, M., Rivière, A., Moens, F., Van den Abbeele, P., Geirnaert, A., Rogelj, I., ... De Vuyst, L. (2016). Inulin-type fructan fermentation by bifidobacteria depends on the strain rather than the species and region in the human intestine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 4097–4107. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7351-9>
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102–114.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003>

Sun, Z., Zhang, W., Guo, C., Yang, X., Liu, W., Wu, Y., ... Zhang, H. (2015).

Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus bifidobacterium: A snapshot of its genetic diversity and evolution e0117912. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117912>

Thomson, P., Medina, D. A., Ortúzar, V., Gotteland, M., & Garrido, D. (2018). Anti-inflammatory effect of microbial consortia during the utilization of dietary polysaccharides. *Food Research International*, *109*(April), 14–23.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.008>

Tódero, L. M., Rechia, C. G. V., & Guimarães, L. H. S. (2019). Production of short-chain fructooligosaccharides (scFOS) using extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus thermomutatus*. *Journal of Food Biochemistry*, *43*(8), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12937>

Trindade, M. I., Abratt, V. R., & Reid, S. J. (2003). Induction of Sucrose Utilization Genes from. *Society*, *69*(1), 24–32. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.24>

Turróni, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in Microbiology*, *5*(AUG), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00437>

Turróni, F., Ventura, M., Buttó, L. F., Duranti, S., O'Toole, P. W., Motherway, M. O. C., & Van Sinderen, D. (2014). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: A *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(2), 183–203.

<https://doi.org/10.1007/s00018-013-1318-0>

Velázquez-Martínez, J. R., González-Cervantes, R. M., Hernández-Gallegos, M. A., Mendiola, R. C., Aparicio, A. R. J., & Ocampo, M. L. A. (2014). Prebiotic potential of *Agave angustifolia* haw fructans with different degrees of polymerization. *Molecules*, *19*(8), 12660–12675.

<https://doi.org/10.3390/molecules190812660>

Versluys, M., Kirtel, O., Toksoy Öner, E., & Van den Ende, W. (2018). The fructan syndrome: Evolutionary aspects and common themes among plants and microbes. *Plant Cell and Environment*, *41*(1), 16–38.

<https://doi.org/10.1111/pce.13070>

Wong, C. B., Sugahara, H., Odamaki, T., & Xiao, J. Z. (2018). Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health. *Beneficial Microbes*, *9*(1), 111–122.

<https://doi.org/10.3920/BM2017.0031>