

## MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A BILIS EN *LACTOBACILLUS REUTERI*, UNA BACTERIA PROBIÓTICA

### MECHANISMS INVOLVED IN BILE RESISTANCE IN *LACTOBACILLUS REUTERI*, A PROBIOTIC BACTERIA

BUSTOS A. Y. <sup>a(\*)</sup>, FADDA S. <sup>b</sup>, FONT DE VALDEZ G. <sup>b,c</sup>, RAYA R. <sup>b</sup>, TARANTO M. P. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones y Transferencia de Santiago del Estero (CITSE-CONICET- UNSE). RN9, km 1125, 4206, Santiago del Estero, Argentina.

<sup>b</sup> Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Chacabuco 145, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina

<sup>c</sup> Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491, T4000ILC, San Miguel de Tucumán, Argentina

(\*) Autor para correspondencia: E-mail: abustos@uspt.edu.ar

#### RESUMEN

*Lactobacillus (L.) reuteri* CRL 1098 es una bacteria probiótica de probado efecto hipocolesterolemizante estrechamente relacionado con su actividad hidrolasa de sales biliares (HSB). La capacidad de *L. reuteri* para sobrevivir el pasaje a través del tracto intestinal y resistir los efectos tóxicos de los ácidos biliares (AB) es un factor clave para su función probiótica. El objetivo de este trabajo es revisar los aspectos más relevantes relacionados con la tolerancia a AB en esta cepa probiótica modelo.

Utilizando técnicas fluorescentes se determinó que la acción deletérea de los AB en bacterias lácticas estaría estrechamente relacionada con la disipación de la fuerza protón motriz. La cepa CRL 1098 presentó elevada resistencia a AB siendo sólo sensible a altas concentraciones de ácido deoxicólico (ADC). Mediante estudios proteómicos se identificaron 25 proteínas diferencialmente expresadas cuando *L. reuteri* fue desafiado con ácido glicodeoxicólico (AGDC) y ADC. Se destaca la enzima citosina trifosfato (CTP) sintetasa, involucrada con la reparación del daño oxidativo del ADN y proteínas relacionadas con transcripción y traducción que fueron sobreexpresadas en presencia de AGDC y reprimidas en presencia de ADC, lo que explicaría la mayor toxicidad de este compuesto. Finalmente, se clonó y caracterizó el operón del gen *hsb* de CRL1098, lo que permitirá profundizar su influencia en la reducción de los niveles de colesterol sérico.

Los resultados presentados en este trabajo proponen que los AB inducen una respuesta fisiológica compleja en *L. reuteri* y proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos implicados en la tolerancia a bilis en cepas probióticas.

Palabras claves: Probióticos, Resistencia a bilis, Electroforesis bidimensional, Hidrolasa de sales biliares

#### ABSTRACT

*Lactobacillus (L.) reuteri* CRL 1098 is a probiotic bacterium with a proven hypocholesterolemic effect, closely related to its bile salt hydrolase activity (BSH). The ability of *L. reuteri* to survive the passage through the intestinal tract and resist the toxic effects of bile acids (BA) is a key factor related to its probiotic function. The aim of this work is to review the main factors related to BA tolerance in this model probiotic strain.

Using fluorescent techniques it was determined that the deleterious action of AB in lactic bacteria is closely related to the dissipation of proton motive force. The CRL 1098 strain shows high resistance to BA being only sensitive to high concentrations of deoxycholic acid (DCA). Using proteomic tools, 25 proteins differentially expressed in *L. reuteri* challenged with glyco-deoxycholic acid (GDCA) and DCA, were identified. The enzyme cytosine triphosphate (CTP) synthetase, involved in the repair of oxidative damage to DNA and three proteins related to the transcription and translation of proteins that were overexpressed in the presence of GDCA and repressed in the presence of DCA, are highlighted. These findings could explain the delayed growth of the cells challenged with DCA. Finally, the operon of the *bsh* gene of CRL1098 was cloned and characterized, which will allow deepening its influence in the reduction of serum cholesterol levels.

The results presented in this work propose that AB induce a complex physiological response in *L. reuteri* and provide new insights into the mechanisms involved in bile tolerance in probiotic strains.

Keywords: Probiotics, Bile resistance, Two-dimensional electrophoresis, Bile salt hydrolase

## Introducción

En la actualidad los conceptos básicos de nutrición han experimentado un cambio significativo. Hoy se pone énfasis en la potencialidad de los alimentos en promover la salud, mejorar el bienestar general y reducir el riesgo de enfermedades. Esto conduce a una mayor demanda de los consumidores por alimentos más saludables en cuyo contexto surgieron los alimentos funcionales, es decir aquellos que además de sus propiedades nutricionales intrínsecas, ejercen un efecto benéfico en el huésped. Dentro de los alimentos funcionales se consideran los probióticos, prebióticos, simbióticos, así como los alimentos enriquecidos con vitaminas, minerales, péptidos bioactivos, entre otros. En el desarrollo de los alimentos funcionales, las bacterias lácticas (BL) ocupan un lugar destacado, debido al efecto benéfico que estos microorganismos ejercen en el hospedador al mejorar el estado general del organismo, característica denominada probiótica. Numerosos estudios han reportado la capacidad de ciertos microorganismos probióticos de estimular el sistema inmunitario, regular la microbiota intestinal, ejercer efecto barrera contra patógenos, efectos anticarcinogénicos, y reducir el colesterol sérico, entre otros (Perdigón et al., 2001; Sullivan y Nord, 2002; Malpeli et al. 2015).

Con el fin de ejercer su acción, los probióticos deben superar las dos principales barreras fisiológicas que regulan la entrada de la microbiota exógena en el tracto gastrointestinal (GIT), es decir, el pH bajo en el estómago y la presencia de bilis en el intestino, cuyos efectos antimicrobianos son conocidos.

La bilis es una solución acuosa verde-amarillenta compuesta principalmente por ácidos biliares (AB), colesterol, fosfolípidos y el pigmento biliverdina. Es sintetizada en los hepatocitos pericentrales del hígado, almacenada y concentrada en vesícula biliar en períodos interdigestivos y liberada a intestino delgado luego de la ingesta de alimentos (Devkota y Chang, 2015). Los AB son detergentes biológicos que facilitan la emulsificación, solubilización y digestión de lípidos dietarios y vitaminas liposolubles, favoreciendo su absorción por las células epiteliales intestinales. Los AB primarios, cólico y quenodeoxicólico, son sintetizados en hígado a partir de colesterol. La solubilidad de los núcleos esteroideos se incrementa gracias a la conjugación de los AB primarios con glicina (glicoconjugados) o taurina (tauroconjugados)

mediante N-acil-amidación. Los AB conjugados se encuentran completamente ionizados y por lo tanto es correcto referirse a ellos como sales biliares. Las moléculas resultantes son por lo tanto anfipáticas y pueden solubilizar lípidos para formar micelas mixtas.

Entre las transformaciones bacterianas más importantes que sufren las secreciones biliares durante el tránsito intestinal se encuentra la hidrólisis del enlace amida de los AB, mediada por la enzima microbiana Hidrolasa de Sales Biliares (HSB). Esta actividad ha sido descrita en diferentes géneros de bacterias intestinales (Chae et al., 2013; Jayashree et al., 2014; Joyce et al., 2014). Algunos autores sugieren una posible relación entre la actividad HSB y la resistencia a bilis en ciertas cepas lácticas (Bustos et al., 2012; Joyce et al., 2014).

Los AB ejercen un efecto inhibitorio sobre la mayoría de los microorganismos Gram positivos y Gram negativos. La respuesta a este efecto depende tanto de la cepa en estudio como del tipo y la concentración del ácido utilizado. El efecto deletéreo se debe, parcialmente, a su carácter detergente ya que presentan un patrón de toxicidad similar al del SDS (Begley et al., 2006; Fernández Murga et al., 2001; Noriega et al., 2006) que puede alterar la membrana plasmática con pérdida de material intracelular (Kurdi et al., 2006).

De hecho, altas concentraciones de bilis pueden disolver fosfolípidos y perturbar la estructura de la bicapa lipídica causando lisis. En simultáneo con los efectos sobre la membrana plasmática, la bilis afecta otras funciones celulares que incluyen, entre otros, disturbios en la estabilidad de macromoléculas: los AB pueden inducir la formación de estructuras secundarias en el ARN e inclusive provocar daño en el ADN activando enzimas involucradas en la reparación de ácidos nucleicos, tanto en células bacterianas como eucariotas (Begley et al., 2005) y contribuir en la desnaturalización de proteínas y como resultado inducir la sobreexpresión de moléculas chaperonas DnaK and GroESL (Flahaut et al., 1996a; Flahaut et al., 1996b; Gahan et al., 2001; Schmidt y Zink, 2000). A su vez, la disociación intracelular de la forma protonada de los AB provoca acidificación intracelular de manera similar al efecto provocado por ácidos orgánicos, lo que conduce al colapso de la fuerza protón motriz, que resulta en la inhibición del transporte de nutrientes (Bustos et al., 2012; Kurdi et al., 2003; Kurdi et al., 2006). Dada la complejidad del estrés generado por la bilis, la capacidad de un microorganismo para tolerar su presencia requiere de una multiplicidad de mecanismos de

defensa que aún no están totalmente esclarecidos.

*Lactobacillus (L.) reuteri* es la especie de *Lactobacillus* más ampliamente distribuida en mamíferos y se suele proponer para el diseño de alimentos funcionales. *L. reuteri* CRL 1098 es una bacteria probiótica de probado efecto hipocolesterolemiante y capacidad para producir corrinoideas con actividad de cobalamina (Molina et al., 2012). Se demostró, por otra parte, una estrecha relación entre la actividad HSB de esta cepa y su capacidad para reducir el colesterol (Taranto et al., 1997), mecanismo que también se ha manifestado *in vivo* (Malpeli et al., 2015; Taranto et al., 2000). La capacidad de *L. reuteri* para sobrevivir el pasaje a través del tracto intestinal y por lo tanto resistir los efectos tóxicos de los AB es un factor clave relacionado con su función probiótica. El objetivo de este trabajo es revisar los aspectos más relevantes relacionados a la tolerancia a sales biliares en esta cepa probiótica modelo.

#### **Tolerancia a bilis en bacterias lácticas**

La tolerancia a sales biliares es considerada un importante criterio en la selección de cepas probióticas para su empleo como suplemento dietario. Aunque no se conoce el grado de tolerancia requerido para un óptimo crecimiento en intestino, es razonable seleccionar los microorganismos más resistentes, ya que esto permite su empleo en menores dosis, garantizando así la inocuidad del producto y el equilibrio de la microbiota endógena.

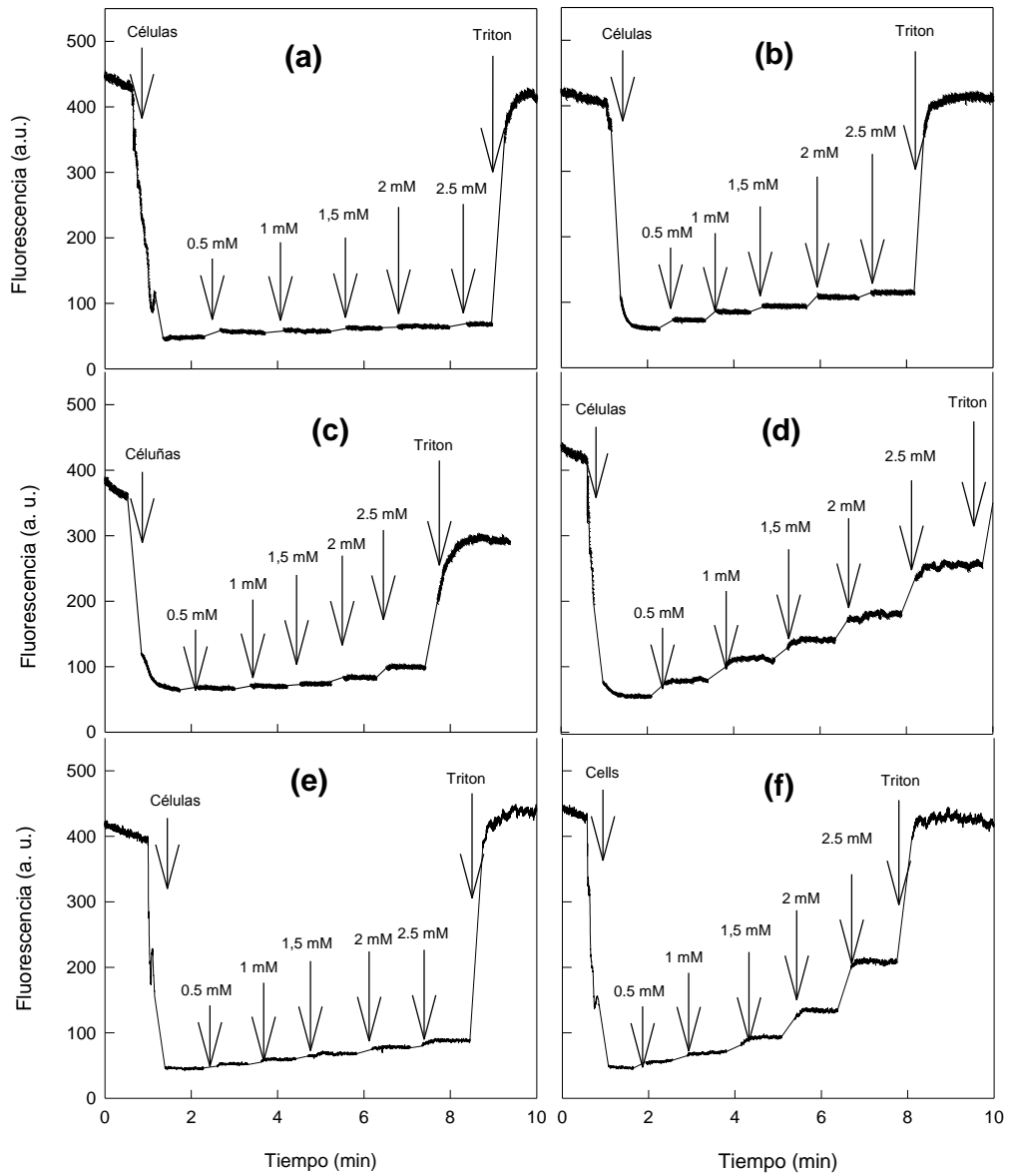
Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo (Bustos et al., 2011) indican que existe una estrecha relación entre la disminución de la viabilidad celular y el incremento del potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ). Estos resultados sugieren que el mecanismo antimicrobiano de los AB está relacionado con la disipación de la fuerza protón motriz. En el estudio se evaluó el efecto de AB conjugados (glico- y taurocólico y glico- y taurodeoxicólico) y libres (cólico y deoxicólico) en concentraciones finales entre 0.5 y 2.5 mM en cepas pertenecientes a la colección de cultivos de CERELA. Se empleó la sonda DiSC<sub>3</sub>(5) que puede acumularse en la bicapa lipídica de células energizadas, resultando en el *self-quenching* de la misma, con atenuación de la fluorescencia. Ante una

alteración de la membrana, la sonda se libera al medio provocando un incremento de la señal fluorescente de manera proporcional al daño producido.

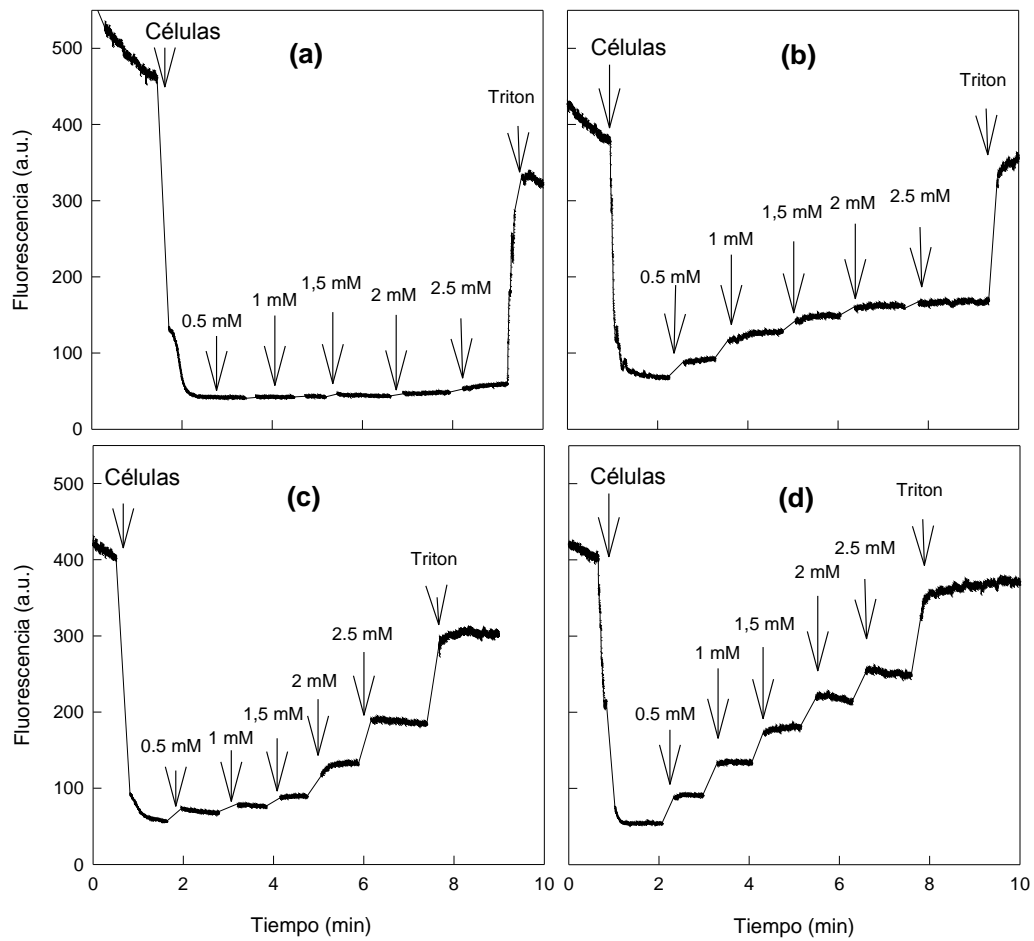
El efecto observado sobre el potencial de membrana varió en función de la cepa, el AB y concentración ensayada (Fig. 1 y 2). La mayoría de las cepas fueron más sensibles a los AB libres (ácido cólico [AC] y ácido deoxicólico [ADC]), siendo el ADC la especie más tóxica. Dentro de los conjugados se observó un mayor efecto tóxico en presencia de los ácidos tauro y glicodeoxiconjugados. *L. reuteri* CRL 1098 mostró elevada resistencia a todos los AB ensayados, siendo sólo sensible a altas concentraciones de ADC, mientras que la cepa *L. delbrueckii* CRL 494 fue la cepa más sensible. Estos ensayos fueron corroborados mediante ensayos de viabilidad, observándose la misma tendencia (Fig. 3).

Las diferencias observadas entre las capacidades inhibitorias de los AB libres han sido previamente reportadas por Kurdi et al., (2006), quienes encuentran que la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del AC fue diez veces mayor que la CIM de ADC para diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, Noriega et al., (2006) encontraron que ciertas especies de *Bifidobacterias* fueron más sensibles a los ácidos conjugados del ácido cólico (AGC y ATC) que a los conjugados del deoxicólico (AGDC y ATDC).

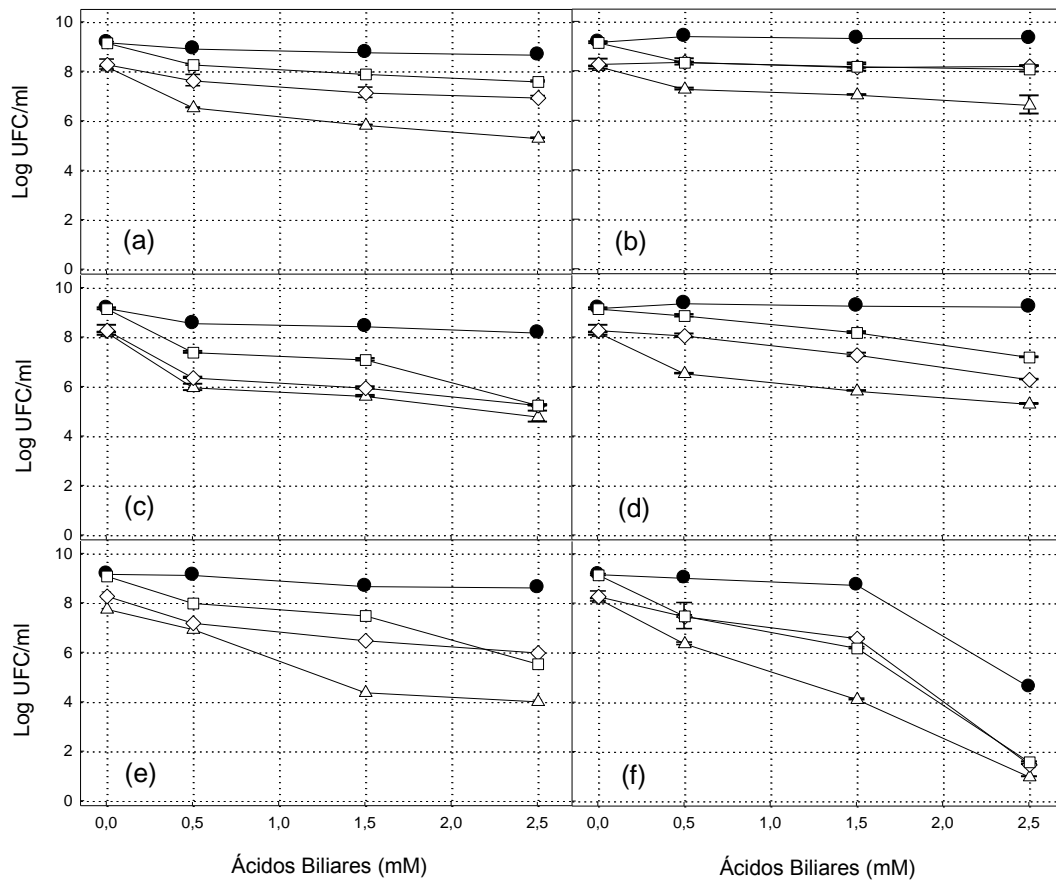
La mayor resistencia de *L. reuteri* CRL 1098 a AB puede explicarse, al menos en parte, teniendo en cuenta la composición intrínseca de su membrana celular. En efecto, el análisis del perfil de ácidos grasos de la cepa CRL 1098 en presencia de bilis revela modificaciones en su patrón de lípidos, mecanismo que le permitiría a la célula mantener la fluidez de su membrana en ambientes hostiles (Taranto et al., 2003). La presencia de 10-oxo- and 10-hydroxi-octadecanoico (C18:0,10-oxo y C18:0,10-OH, respectivamente) es probablemente una característica de los microorganismos cultivados en presencia de bilis. Estas moléculas jugarían un rol en la permeabilidad de la membrana celular y en su resistencia de las células al congelamiento (Fernández Murga et al., 2001).



**Figura 1.** Efecto de AB conjugados sobre el potencial eléctrico transmembrana de *L. delbrueckii* CRL 494 (Der.) y *L. reuteri* CRL 1098 (Izq.), (a, b), ATC; (e, f), AGDC; (g, h), ATDC.



**Figura 2.** Efecto de AB libres sobre el potencial eléctrico transmembrana de *L. delbrueckii* CRL 494 (Der.) y *L. reuteri* CRL 1098 (Izq.) (a, b), AC; (c, d), ADC.



**Figura 3.** Efecto de AB sobre la viabilidad celular de cepas probióticas. (●) *L. reuteri* CRL 1098; (△) *L. delbrueckii* CRL 494; (◇) *L. acidophilus* CRL 1072; (□) *L. casei* CRL 203. (A) AGC; (B) ATC; (C) AGDC; (D) ATDC; (E) AC; (F) ADC.

**Mecanismos de adaptación a estrés por sales biliares de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. Enfoque proteómico**

La habilidad de las bacterias para responder a diversas condiciones de estrés es esencial para su supervivencia. En los microorganismos operan distintos tipos de respuestas, que mediante la acción de uno o más reguladores principales e independientes del estímulo inicial, proveen protección frente a una variedad de agresiones ambientales relacionadas o no. Entre las proteínas claves en esta respuesta se encuentran chaperonas, proteasas y diversos factores reguladores (Yura et al., 1993), las cuales están altamente conservadas desde un punto de vista evolutivo. Estas proteínas están involucradas en la maduración de aquellas recientemente sintetizadas, en su correcto

plegamiento o en la degradación de proteínas desnaturalizadas (Georgopoulos y Welch 1993). Como ya fuera señalado los AB, principales constituyentes de la bilis, son detergentes biológicos que alteran principalmente la estructura de bicapa lipídica de las membranas celulares. Aún no se conocen con precisión los complejos mecanismos de adaptación desarrollados por los microorganismos para tolerar la presencia de bilis. En particular, es escasa la información disponible respecto de la respuesta desarrollada por bacterias potencialmente probióticas frente al desafío producido por los AB.

A pesar de la información genómica disponible a partir de los diferentes proyectos de secuenciación de cepas de bacterias lácticas, aún resta revelar la función biológica de las

proteínas codificadas por los genes encontrados. En este sentido, la proteómica está enfocada en establecer la funcionalidad de estos genes contribuyendo a establecer la conexión entre las secuencias en el genoma y su rol biológico. Además, la proteómica demostró ser una herramienta útil para evaluar cambios en los niveles de expresión de numerosas proteínas expresadas bajo determinadas condiciones, permitiendo una visión global del proteoma de un organismo (Lilley y Friedman, 2004). La expresión de las diferentes proteínas es un reflejo del medioambiente en el que se encuentra el organismo y a diferencia del genoma, es altamente dinámico (Champomier-Vergès et al., 2002). Una de las principales herramientas proteómicas desarrolladas es la electroforesis bidimensional (2DE) que permite en un sólo experimento la separación de hasta cientos de proteínas, en función de la carga en una primera dimensión (isoelectroenfoque) y en la segunda en función de su masa (SDS-PAGE). Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta adaptativa de cepas lácticas a las condiciones del tracto intestinal se abordó un estudio proteómico. Se evaluó el efecto de AB sobre la expresión de proteínas citoplasmáticas totales de *L. reuteri* CRL 1098, cepa utilizada como modelo por su resistencia tanto a AB conjugados como libres (Bustos et al., 2015).

#### **Comportamiento de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 en presencia de ácidos biliares**

El efecto de AB conjugados y libres sobre la cinética de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1098 fue evaluado comparando su desarrollo durante 24 h en presencia y ausencia de 1 mM AGDC y ADC. El ADC afectó significativamente los parámetros de crecimiento celular de la cepa en estudio mientras que la adición de AGDC a la misma concentración no afectó el desarrollo presentando una cinética de crecimiento similar al observado en las células que crecieron en ausencia de AB.

#### **Perfil de proteínas expresadas en presencia de ácidos biliares**

Se evaluó la expresión diferencial de proteínas de *L. reuteri* CRL 1098 mediante electroforesis bidimensional (2DE) en un gradiente de pH de 4-7, rango característico del proteoma de BL de acuerdo a la bibliografía (Savijoki et al., 2005). Una proteína fue considerada diferencialmente expresada si presentó un incremento o disminución  $\geq 1.5$  veces y si el cambio fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), comparando cada condición respecto del control

(sin el agregado de AB). El patrón de proteínas obtenido a partir de células crecidas en presencia de AGDC reveló que 22 proteínas fueron diferencialmente expresadas, de las cuales 14 fueron sobreexpresadas y 8 fueron reguladas negativamente. En presencia del ADC 28 proteínas cambiaron su perfil de expresión; 13 fueron reguladas positivamente y 15 disminuyeron su expresión (Figura 4).

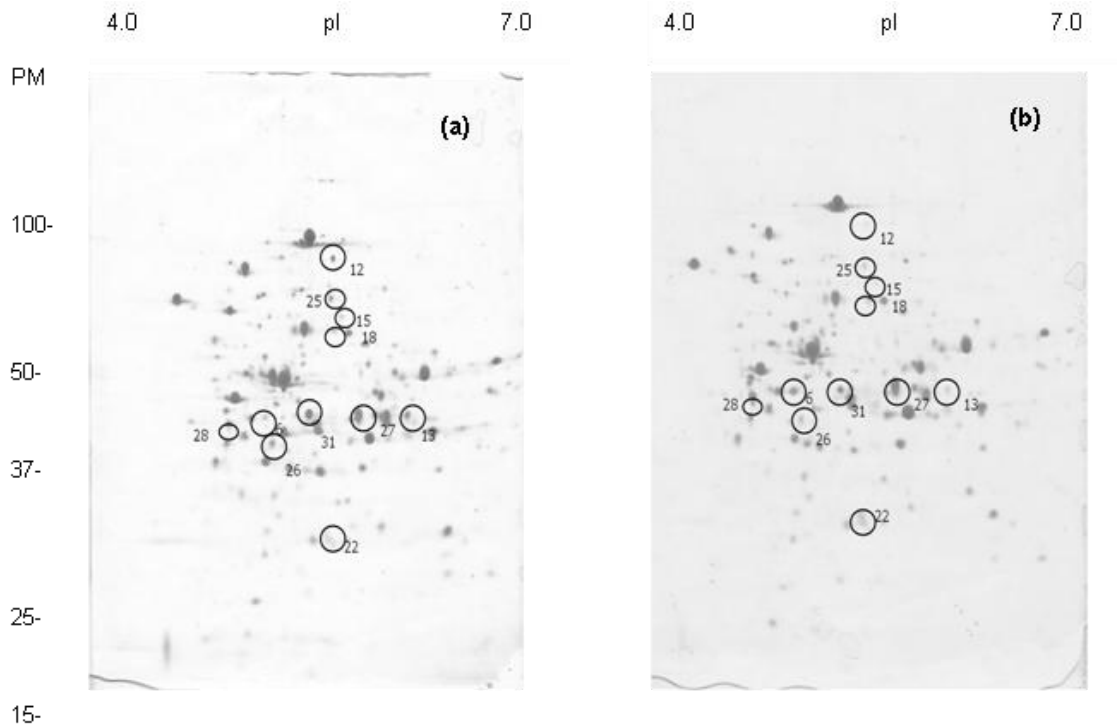
A partir de los resultados obtenidos de la aplicación de la electroforesis bidimensional, se seleccionaron 32 proteínas que presentaron los cambios de mayor magnitud en su expresión en ambas condiciones. Las manchas correspondientes a dichas proteínas fueron extraídas del gel 2D y sometidas a digestión con tripsina y posterior análisis por espectrometría MALDI-TOF-TOF, resultando 25 proteínas exitosamente identificadas (Tabla 1).

Dentro de las 25 proteínas de respuesta a AB secuenciadas, aquellas involucradas en el metabolismo de nucleótidos y de glicerolípidos fueron las más abundantes con 7 y 6 proteínas identificadas en cada grupo funcional, respectivamente. Las restantes incluyen proteínas relacionadas al metabolismo de aminoácidos (2), transcripción y traducción (4), metabolismo energético (1), relacionadas a estrés y a homeostasis de pH (3) y dos proteínas de función desconocida.

Categoría funcional	Proteína identificada	Nº de acceso	PI	PM	Nº de mancha	Expresión relativa	Comentario
<b>Metabolismo de glicerolípidos</b>	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_1840	4.70	40691.2	6	2.5	RP en GDCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_0030	5.63	42172.7	13	1.8	RN en GDCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_1840	4.70	40691.2	5	2.6	RP en DCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_1734	6.10	40353.1	1	5.1	RN en DCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_0030	5.63	42172.7	18	2.0	RN en DCA
	factor reactivador de la dehidratasa diol/glicerol	<u>Lreu_1744</u>	5.32	65682.8	2	3.2	RN en DCA
<b>Transcripción y traducción</b>	treonil-ARNt sintetasa	Lreu_1863	5.01	68754.2	25	1.5	RP en GDCA
	factor de elongación Ts	Lreu_0685	4.66	31956.2	26	1.5	RP en GDCA
	factor de elongación G	Lreu_1486	4.52	76756.9	18	1.6	RP en GDCA
	proteína ribosomal 50S L29P	Lreu_1735	5.18	51117.5	81	1.7	RN en DCA
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>	cistationina gamma-liasa	Lreu_0293	4.87	41473.1	31	1.5	RP en GDCA
	aminotransferasa	Lreu_0744	4.84	43099.4	69	1.6	RP en DCA
<b>Respuesta a estrés y a homeostasis de pH</b>	proteína TypA ligadora de GTP	Lreu_0637	4.92	68815.7	3	1.8	RP en GDCA
	ornitina carbamoiltransferasa	Lreu_0425	5.20	37553.0	27	1.5	RP en GDCA



	chaperonina GroEL	Lreu_0354	4.46	57112.7	3	3.2	RP en DCA
<b>Metabolismo de nucleótidos</b>	CTP sintetasa	Lreu_023	5.07	59589.8	15	1.7	RP en GDCA
	CTP sintetasa	Lreu_023	5.07	59589.8	8	2.4	RN en DCA
	hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina	Lreu_0102	4.48	32567.0	10	2.3	RN en DCA
	hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina	Lreu_1658	4.54	34899.4	28	1.5	RP en GDCA
	hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina	Lreu_1658	4.54	34899.4	7	2.5	RP en DCA
	formato-tetrahidrofolato ligasa	Lreu_0131	5.5	60240.9	15	2.0	RN en DCA
	adenilsuccinato sintetasa	Lreu_0069	5.36	47716.5	27	1.7	RN en DCA
<b>Metabolismo de carbohidratos (piruvato)</b>	dehidrogenasa de 2-hidroxiácidos NAD-dependiente	<u>Lreu_1631</u>	4.55	36559.3	31	1.6	RN en DCA
<b>Función desconocida</b>	proteína de microcompartimentos	Lreu_1748	5.07	24940.6	22	1.6	RP en GDCA
	proteína hipotética	Lreu_1196	4.56	35190.9	12	2.2	RN en DCA



**Figura 4.** Geles 2-DE de proteínas citoplasmáticas de *L. reuteri* CRL 1098. Las manchas numeradas indican las proteínas expresadas en forma diferencial en presencia de AGDC (a) y ADC (c); (b) y (d) corresponden a los geles control en ausencia del ácido conjugado y libre, respectivamente. En rojo se indica una mancha que podría corresponder a la HSB de *L. reuteri* CRL1098 y que no fue identificada.

#### ***Proteínas involucradas en mecanismos de transcripción y traducción***

Se identificaron cambios en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la regulación de la transcripción y traducción, que sugieren una modulación de la síntesis de proteínas en respuesta a AB. Esto representa un fenómeno común en bacterias desafiadas por otros tipos de estrés (Budin Verneuil et al., 2007; Begley et al., 2003).

Durante la traducción, los factores de elongación son los responsables de la entrega de los aminoacil-ARNt al ribosoma (Stark et al., 1997). El factor de elongación Ts L29P y el factor de elongación G fueron sobreexpresados en *L. reuteri* CRL 1098 en presencia de AGDC. En tanto que la proteína ribosomal 50S y la sintetasa de treonil-ARNt fueron reguladas negativamente en presencia de ADC y AGDC, respectivamente. Lee et al., (2008) reportaron que la expresión del factor de elongación Ts fue inhibida en *L. reuteri* ATCC 23272 desafiado con 0,06% y 0,12% de bilis. Las diferencias observadas podrían explicarse parcialmente por la mayor sensibilidad de la cepa *L. reuteri* ATCC 23272, respecto de la cepa CRL 1098.

En efecto, las concentraciones de bilis utilizadas en el estudio de Lee et al. (2008) afectaron la viabilidad celular de la cepa ATCC 23272 mientras que el AGDC a la concentración evaluada no resulta tóxico para *L. reuteri* CRL 1098. Por el contrario, dos proteínas identificadas como factores de elongación Tu y P fueron sobreexpresados en *Bifidobacterium (B.) longum* NCIMB 8809 (Sánchez et al., 2005) en presencia de 0.3% de bilis. Bøhle et al., (2010) informaron que la expresión del factor de elongación G se reprime transitoriamente a los 20 y 60 min y luego resulta estimulado a los 120 min cuando *Enterococcus (E.) faecalis* V583 fue desafiado con 1% de bilis. En relación a la proteína ribosomal 50S, los resultados concuerdan con lo informado previamente para *B. longum* NCIMB 8809 (Sánchez et al., 2005) donde esta proteína fue reprimida en presencia de 0,06% y 0,12% de bilis. Por el contrario, la proteína ribosomal 50S fue ligeramente sobreexpresada en *L. reuteri* ATCC 23272 en ambas concentraciones de bilis ensayadas (Lee et al., 2008). Es posible que el incremento en la expresión de proteínas relacionadas a la traducción le permita a los

microorganismos adaptarse a condiciones adversas y mantener su viabilidad.

### **Metabolismo de nucleótidos**

Algunas proteínas involucradas con el metabolismo de purinas y pirimidinas modificaron su perfil de expresión en respuesta a AB en la cepa en estudio. Este grupo incluye la hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina, la CTP sintetasa, la formato-tetrahidrofolato ligasa y la adenilosuccinato sintetasa. Bajo condiciones de estrés la enzima formato-tetrahidrofolato ligasa es requerida para la síntesis de metabolitos, incluyendo purinas, pirimidinas y formil ARNt-met, que estimulan el crecimiento bacteriano (Bustos et al., 2015). Esta enzima fue regulada negativamente en respuesta a ADC, lo que sugeriría que este compuesto modifica el balance celular, impactando en el metabolismo de nucleótidos y reprimiendo, por lo tanto, el crecimiento de la cepa CRL 1098 en esta condición. Lee et al., (2008), encuentran que esta proteína se encuentra ligeramente sobreexpresada en *L. reuteri* ATCC 23272.

La enzima CTP sintetasa, involucrada en el metabolismo de citosina, presenta un comportamiento dual frente a los AB ensayados. En presencia de AGDC, esta enzima fue positivamente regulada y, por el contrario, fue significativamente reprimida en presencia de ADC (Tabla 1). La CTP sintetasa se encuentra asociada a la reparación del daño oxidativo causado por bilis al ADN, lo que explicaría la menor sobrevida de las células expuestas al AB libre. Esta enzima fue regulada positivamente en *B. longum* NCIMB 8809 (Sánchez et al., 2005) y en la derivada resistente a bilis de *B. animalis* subsp. *lactis* 4549dO mientras que en la cepa silvestre la enzima fue reprimida (Sánchez et al., 2007). Por otra parte, la represión de la proteína adenilosuccinato sintetasa involucrada en el metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos en presencia ADC, indicaría una inhibición de la síntesis macromoléculas como ADN, ARN y ATP lo que se refleja en la menor adaptación y supervivencia de la cepa CRL1098 frente a este compuesto. Regulación negativa de los genes relacionados a la síntesis de nucleótidos fue informado previamente para *Latococcus (Lc.) lactis* en condiciones de estrés ácido (Xie et al., 2004). Por otra parte, en *L. plantarum* WCFS1 se observó represión de la transcripción del gen que codifica para la adenilosuccinato sintetasa, cuando fue sometido a estrés osmótico (Pieterse 2006).

La enzima hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina fue identificada a partir de las manchas 7 y 10 obtenidas en la

cepa CRL1098 en presencia de ADC. Es posible que las diferentes manchas correspondan a isoformas de la misma proteína o sean producto de fragmentación proteolítica o resulten de una modificación post-traducciona. Esta proteína también se identificó a partir de la mancha 28 evidenciada por efecto del AGDC. Es importante resaltar que esta proteína resultó regulada positivamente en presencia de ambos AB (mancha 7 [Lreu\_1658] y 28 [Lreu\_1658]) mientras que una isoenzima (mancha 10 [Lreu\_0102]) fue significativamente reprimida en presencia de ADC. Esta enzima hidroliza nucleósidos o nucleótidos, aunque con preferencia de sustrato por uridina e inosina, liberando D-ribosa.

### **Proteínas involucradas en respuesta a estrés**

Los genes involucrados en respuesta general a estrés se encuentran altamente conservados en bacterias. Estos incluyen una larga lista de proteínas generalmente involucradas en la maduración de nuevas proteínas sintetizadas, en proteínas asociadas a membranas y en el repliegamiento o degradación de proteínas desnaturalizadas y en la reparación del ADN (Georgopoulos et al., 1993; Gottesman 1984).

En presencia de AGDC, una proteína identificada como TypA ligadora de GTP fue regulada positivamente en *L. reuteri* CRL 1098. Esta proteína está involucrada en el mantenimiento de la funcionalidad de proteínas de membrana (Baev et al., 1999).

Una chaperona identificada como GroEL (mancha 3), frecuentemente involucrada en procesos de respuesta a estrés, fue significativamente sobreexpresada en células de *L. reuteri* CRL1098 desafiadas con ADC. Similares resultados fueron reportados para *B. longum* (Sánchez y col 2005) en presencia de 0.06% y 0.12% de bilis. El nivel de inducción fue mayor a la menor concentración ensayada, lo que sugiere que niveles basales de bilis son suficientes para gatillar la respuesta mediada por esta chaperona. La síntesis de chaperonas, que promuevan el plegamiento correcto de proteínas, es una respuesta común en diferentes géneros bacterianos hacia varios tipos de estrés ambientales, entre ellos estrés ácido, térmico y osmótico (Leverrier et al., 2003; Wilkins et al., 2001; Hecker y Völker 2001; Ventura et al., 2004).

### **Proteínas involucradas en la homeostasis de pH y en el metabolismo de aminoácidos y de carbohidratos**

En presencia de bilis se encuentran afectadas todas las funciones celulares y por lo tanto la regulación de la homeostasis resulta esencial

bajo esta condición de estrés. Cuando las células de *L. reuteri* CRL 1098 fueron desafiadas con AGDC se detectó la sobreexpresión de una proteína involucrada en la homeostasis de pH que fue identificada como ornitina carbamoiltransferasa. Esta enzima, involucrada en la desaminación de arginina, contribuye a la generación de fuerza protón motriz y eleva el pH intracelular para compensar el estrés ácido (Rollan et al., 2003). Similar comportamiento mostraron *L. reuteri* ATCC 23272 en respuesta a bilis (Lee et al., 2008). En *E. faecalis* V583 se informó una inhibición transitoria de ornitina carbamoiltransferasa a los 60 min de crecimiento y, por el contrario, la proteína se encuentra sobreexpresada a los 20 y 120 min de exposición (Bøhle et al., 2010).

La proteína dehidrogenasa de 2-hidroxiácidos NAD-dependiente, involucrada en la conversión de D-lactato a piruvato, fue inhibida en presencia de ADC, lo que determinaría la disminución de NADH. Proteínas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos fueron sobreexpresadas en cultivos de la cepa CRL1098 expuestos a AB. Las proteínas cistationina  $\gamma$ -liasa y aminotransferasa, involucradas en la biosíntesis de lisina, se sobreexpresaron en presencia de AGDC y ADC, respectivamente.

#### ***Proteínas involucradas en el metabolismo de glicerolípidos***

La expresión de muchas proteínas implicadas en el metabolismo de los glicerolípidos se vio afectada en presencia de ambos AB. Entre estas proteínas, podemos destacar el factor de reactivación de diol/glicerol deshidratasa (mancha n° 2), que cataliza la reacción de 3HPA a glicerol en *L. reuteri* CRL1098, y tres isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (IAD) que contienen hierro. De hecho, Lreu\_1840 (puntos n° 5 y 6), Lreu\_0030 (n° 13 y 18) y Lreu\_1734 (punto n° 1), identificados como isoenzimas de IAD, se expresaron diferencialmente en la cepa CRL1098 en presencia de ambos BA. Estas enzimas están involucradas en diferentes etapas de la vía de los glicerolípidos. En presencia de AGDC y ADC se sobreexpresó la isoenzima Lreu\_1840, responsable de la producción de glicerol. En contraste, las manchas identificadas como Lreu\_0030 implicadas en la síntesis de 1-propanol tuvieron un nivel de expresión disminuido en presencia de AGDC y DCA. Curiosamente, la isoenzima Lreu\_1734 implicada en la conversión de 1-propanol a propanal tenía una reducción negativa significativa (cinco veces respecto al control) en presencia de ADC. Esta reacción es muy

necesaria para asegurar el suministro de NAD a la célula y podría explicar parcialmente la mayor toxicidad de la BA libre y la adaptación tardía de las células a la presencia de ADC.

Dos proteínas de función desconocida, una proteína de microcompartimentos y una proteína hipotética, fueron reguladas positiva y negativamente en presencia de AGDC y ADC, respectivamente.

#### **Caracterización del gen hidrolasa de sales biliares de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098**

La enzima Hidrolasa de Sales Biliares (HSB) ha sido descrita en una amplia variedad de especies de los géneros *Bifidobacterium* (Grill et al., 2000; Grill et al., 1995; Kim et al., 2004; Tanaka et al., 2000), *Clostridium* (Kishinaka et al., 1994), *Listeria* (Begley et al., 2002), *Enterococcus* (Knarreborg et al., 2002) y *Lactobacillus* (Bateup et al., 1995; Christiaens et al., 1992; Dashkevich et al., 1989; De Boever et al., 1999; Elkins et al., 2001; Tannock et al., 1989; Taranto et al., 1999). Con la excepción de dos especies de *Bacteroides* (Kawamoto et al., 1989; Stellwag et al., 1976) todas las bacterias HSB (+) descritas son Gram positivo. Las secuencias nucleotídicas de algunas enzimas HSB de bacterias potencialmente probióticas se encuentran disponibles en bases de datos públicas. Resulta interesante que ciertas especies poseen más de un gen *hsb* homólogo, aunque no idénticos entre ellos.

Considerando que la enzima HSB de *L. reuteri* CRL 1098 está estrechamente relacionada con su función probiótica se identificó y caracterizó el gen *hsb* de la cepa CRL1098.

#### **Amplificación y análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *hsb* de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098**

El gen *hsb* de *L. reuteri* CRL 1098 se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores (F1 - HSB: 5'GCCCAAAGTTCAAGGACAAGCAGA3' y R2 - HSB: 'CCACGCAATCGCAACTGAAGTAT3') diseñado basado en las secuencias que codifican el gen *hsb* de la cepa DSM 20016 (WP\_003668136.1). El fragmento secuenciado contiene un único marco de lectura abierta de 978 nucleótidos limitado por un codón de iniciación de metionina ATG y un codón de terminación de la traducción TAA. Una estructura tipo promotor está situada de 22 a 72 nucleótidos "corriente arriba" (*upstream*) del codón ATG, así como una secuencia de ADN palindrómico capaz de formar una estructura tallo-bucle corriente abajo (*downstream*) de la estructura del gen. De hecho, un terminador

potencial de la transcripción tipo *rho*-independiente (AG = -14,1 kcal/mol) seguido de una secuencia rica en T se reconoció 20 nucleótidos corriente abajo del codón de terminación, indicando que el gen *hsb* de la cepa CRL 1098 se transcribe como una unidad monocistrónica. Si bien los transcritos monocistrónicos de *hsb* constituyen el hallazgo más frecuente en muchos otros grupos de bacterias, en *L. johnsonii* (Elkins et al., 2001) y *B. longum* (Tanaka et al., 2000) se han reportado transcritos policistrónicos. La secuencia nucleotídica deducida codifica un polipéptido de 325 aminoácidos, para el cual se ha calculado una peso molecular de 36098.1 Da y un pI de 4.81. El análisis de la secuencia de aminoácidos no presenta señales de secreción, lo que sugiere que la proteína resultante es intracelular.

La comparación de las secuencias de aminoácidos (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) reveló que la HSB de la cepa CRL 1098 es idéntica a su homóloga en *L. reuteri* DSM 20016 (WP\_003668136.1) y comparten alta identidad de secuencia (entre 97 y 98%) con las HSB de *L. reuteri* TD1 (WP\_019254138.1), *L. reuteri* 100-23 (WP\_003665850) y *L. reuteri* ATCC 53608 (WP\_003674287) y en menor medida (55%) con las enzimas HSB de varias cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus*.

El análisis de secuencias nucleotídicas de enzimas HSB muestra identidad con las amidasas de penicilinas cuya función no ha sido claramente establecida. Este grupo de enzimas reconoce el mismo tipo de unión química aunque la estructura de los diferentes sustratos difiere significativamente unas de otras. Algunas de estas enzimas pueden escindir fenol y ácido fenoxicético además de penicilina (Valle et al. 1991). Estos compuestos, abundantes en el ambiente, podrían ser sustrato de las HSB cuyos derivados podrían ser utilizados por la célula como fuentes de carbono alternativas en condiciones limitantes de nutrientes. Esta familia incluye, además a acilasas de homoserin-lactonas, que juegan un rol importante en la regulación de genes dependientes de “*quorum-sensing*” en bacterias Gram negativas. En particular, la proteína HSB de la cepa CRL 1098 comparte homología de secuencia con la acilasa de penicilina V (PVA) de *Listeria (List.) monocytogenes* EGDe. El análisis de múltiples secuencias de aminoácidos de diferentes HSBs y PVA alineadas revelan que cinco residuos de aminoácidos catalíticamente importantes (C, D, N, N y R) están altamente conservadas en la cepa CRL 1098 mientras que cuatro motivos (YFGRNXD,

NEXGLXXAGLNF, VXVLTNNPXF y SXSRLFVRXAF), localizados alrededor del sitio activo fueron parcialmente conservado (Bustos et al., 2016). El residuo Cys-2 se convierte en el centro catalítico después de la eliminación de la formil metionina inicial mediante un proceso autoproteolítico característico de la superfamilia de hidrolasas (Begley et al., 2006). El grupo tiol (SH) de Cys-2 ha demostrado ser esencial para la catálisis y se encuentra altamente conservado en un gran número de microorganismos (Begley et al., 2006; Taranto et al., 1999). Por otra parte, el análisis del árbol filogenético reveló que los genes *hsb* en cepas de *L. reuteri* están estrechamente relacionadas, pero difiere de las enzimas de otros géneros y de la PVA de cepas de *Bacillus* y *Listeria* (Bustos et al., 2016).

La regulación de HSB a nivel genómico, transcriptómico o proteómico fluctúa fuertemente según el microorganismo estudiado (Bustos et al., 2016). Aunque ninguna de las proteínas secuenciadas en la cepa CRL1098 correspondió con la enzima HSB, la mancha no. 29 que coincide en pI y masa con la HSB fue sobreexpresada 1,5 veces en presencia de AGDC (Figura 4). Sin embargo esta mancha no pudo ser identificada con éxito por Maldi Tof MS-MS.

Al respecto, no se observaron modificaciones en la expresión de HSB a nivel transcriptómico y proteómico cuando *L. reuteri* ATCC 23272 y *E. faecalis* V583 fueron desafiados con bilis (Bøhle et al., 2010; Lee et al., 2008). Por el contrario, en la cepa *L. plantarum* 299V resistente a bilis se observó sobreexpresión de la enzima HSB, mientras que no detectaron cambios en cepas sensibles, estrechamente relacionadas (Hamon et al., 2011). Por otra parte, en la cepa *B. animalis* 4549dOx, variante resistente a bilis, se detectaron importantes niveles de actividad HSB y significativa sobreexpresión de la enzima cuando la cepa fue expuesta a bilis. Estos resultados sugieren una posible relación entre la adquisición de resistencia a AB y la elevada actividad de deconjugación (Sánchez et al., 2007).

### Conclusiones

*L. reuteri* CRL 1098 es una bacteria probiótica de probado efecto hipocolesterolemiante, estrechamente relacionado con su actividad HSB. La capacidad de *L. reuteri* para sobrevivir el pasaje a través del tracto intestinal y por lo tanto resistir los efectos tóxicos de los AB es un factor clave relacionado con su función probiótica.

Los resultados presentados en esta revisión muestran que los AB inducen una compleja respuesta fisiológica en *L. reuteri* CRL 1098.

Este trabajo permitirá avanzar y profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la tolerancia a bilis por parte de bacterias intestinales y potencialmente probióticas.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. La Dra. Bustos desea agradecer muy especialmente a la Universidad San Pablo T por los subsidios otorgados

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achary AA, Prapulla SG (2011) Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 2-6.
- Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof, RM, Hassan FL (2013) Prebiotics as functional foods: A review. *J Func Foods* 5: 1542-1553.
- Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, y col. (2011) Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol Res* 63: 366-376.
- Barayni, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277e294.
- Barreteau H., Delattre C. & Michaud P. (2006). Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol*, 44, 323-333.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Cesca, B.; Manca De Nadra, M. C.; Strasser De Saad, A. M.; P. De Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. (1984).  $\beta$ -D-galactosidase of *Lactobacillus* species. *Folia Microbiol.* , 29, 288-294
- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. (2001). Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 73 (2 Suppl):421S-429S. Review
- FAO/WHO (2002) Probiotics in Foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>
- Gänzle M (2012) Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *Int Dairy J* 22: 116-122.
- Garman, J.; Coolbear, T.; Smart, J. (1996). The effects of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalyzed by  $\alpha$ -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 22-27.
- Gosling, A., Stevens, G.W., Barber, A.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121: 307–318.
- Huang, D. Q.; Prevost, H. and Divies, C. (1995). Principal characteristics of

- $\beta$ -galactosidase from *Leuconostoc* spp. Int. Dairy Journal, 5, 29-43.
- Hsu, C.A.; Lee, S.L and C. C. Chou (2007). Enzymatic Production of Galactooligosaccharides by  $\alpha$ -Galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. J. Agric. Food Chem. 55, 2225-2230
  - Iqbal S., Nguyen, T.; Nguyen, T.; Maischberger, T.; and D. Haltrich (2010).  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galactooligosaccharides. Carbohydrate Research 345: 1408–1416.
  - Itoh, T.; Ohhashi, M.; Toba, T. and Adachi, S. (1980). Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. Milchwissenschaft 35, 593-597.
  - Iwasaki, K., Nakajima, M., Nakao, S. Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using  $\beta$ -Galactosidase. Process Biochem.1996; 31 (1): 69 – 76.
  - Juers, D. H.; Jacobson, R. H.; Wigley, D.; Zhang, X. J.; Huber, R. E.; Tronrud, D. E.; Matthews, B. W. (2000). High-resolution refinement of  $\beta$ -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides structural basis for  $\alpha$ -complementation. Protein Sci., 9, 1685-1699
  - Li, W., Xiang, X.; Tang, S. Hu, B.; Tian, L.; Sun, Y.; Ye, H. and X. Zeng (2009). Effective Enzymatic Synthesis of Lactosucrose and Its Analogues by  $\beta$ -D-Galactosidase from *Bacillus circulans* J. Agric. Food Chem. 57, 3927–3933.
  - Marteau, P.; Vesa, T. and Rambaud, J. C. (1997). Lactose maldigestion p 65-88. In: R.Fuller (ed.), Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman & Hall, London UK.
  - Montes, R. G.; Bayles, T. M.; Saavedra, J. M. and Perman, J. A. (1995). Effect of milks Inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose Maldigesting children. J. Dairy Sci. 78, 1657-1664.
  - Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. (2006). Management and treatment of lactose malabsorption. World J Gastroenterol. 4;12(2):187-91.
  - Nguyen et al 2006 Nguyen, T.-H.; Splechtina, B.; Steinböck, M.; Kneifel, W.; Lettner, H. P.; Kulbe, K. D.; Haltrich, D. Purification and characterization of two novel  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 4989–4998
  - Nguyen, T., Nguyen, H.A., Arreola, S.L., Mlynek, G., DjinoVIC-Carugo, K., Mathiesen, G. Nguyen, T., Haltrich, D. (2012). Homodimeric  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and Biochemical Characterization. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 1713–1721
  - O'Connell, S., Walsh, G. (2010). A novel acid-stable, acid-active  $\beta$ -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance.

- Applied of Microbiology and Biotechnology*, 86: 517–524.
- Otieno D.O. (2010). Synthesis of b-galactooligosaccharides from lactose using microbial b-galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 471–482
  - Rabiou, B., Jay, A., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2000). Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2526 – 2530.
  - Rastall R, Maitin V (2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Op Biotechnol* 13, 490–496.
  - Raibaud, P.; Caulet, M.; Galpin, J.V. and Mocquot, G. (1961) Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *Journal of Applied Bacteriology* 24, 285 – 291.
  - Roberfroid M (2007) Prebiotics: The Concept Revisited. *J Nutr* 137: 830-837.
  - Savaiano, D. A.; Levitt, M. D. (2000). Lactose Intolerance. In: *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. Second Edition, CRC Press LLC.: 311-354.
  - Splechna, B., Nguyen, TH., Haltrich, D. Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose using  $\beta$ -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J.Agric. Food Chem* 2006; 54: 4999-5006.
  - Tymczyszyn E.E., Gerbino E., Illanes A. & Gómez-Zavaglia A. (2011). Galactooligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, 62, 123-129.
  - Yanahira S, Yabe Y, Nakakoshi M, Miura S, Matsubara N, Ishikawa H. (1998). Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by *Bacillus circulans* beta-galactosidase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62(9):1791-1794.
  - Yeoman CJ, White BA (2014) Gastrointestinal Tract Microbiota and Probiotics in Production Animals. *Annu Rev Anim Biosci* 2: 469–486.
  - Zárate y col., 2003; Zárate G, Perez Chaia A, Oliver G (2003) Some Characteristics Of Practical Relevance Of  $\beta$ -Galactosidase From Potential Probiotic Strains Of *P. acidipropionici*. *Anaerobe* 8: 259-267.
  - Zárate, G., Saez, G., Pérez Chaia, A. (2013). Microbial transformation of lactose: potential of  $\beta$ -galactosidases for probiotic and prebiotic purposes. En: *Lactose: structure, food industry applications and role in disorders*. (Eds: David Green and Emma Lee). ISBN: 978-1-62808-198-5 Nova Science Publishing, USA.
  - Zhang, W., Wang, C., Huang, C., Yu, Q., Liu, H., Zhang, C., Pei, X., Xu, X., Wang, G. (2012). Analysis of b-galactosidase production and their genes of two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol Lett.* 34:1067–1071.