

CRECIMIENTO, SOBREVIVENCIA Y ADAPTACIÓN DE *Bifidobacterium infantis* A CONDICIONES ÁCIDAS

GROWTH, SURVIVAL AND ADAPTATION OF *Bifidobacterium infantis* TO ACIDIC CONDITIONS

L. Mayorga-Reyes¹, P. Bustamante-Camilo², A. Gutiérrez-Nava³,
E. Barranco-Florido¹ y A. Azaola-Espinosa^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Depto. Sistemas Biológicos. Calz. del Hueso 1100, Coyoacán 04960,
México D.F.

²Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana

³Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,
Carretera Pachuca-Tulancingo, Km 4.5. Mineral de la Reforma Hidalgo

Recibido 13 de Octubre 2009; Aceptado 17 de Noviembre 2009

Resumen

La acidez es una condición ambiental comúnmente encontrada por las bacterias presentes en productos lácteos fermentados y el tracto gastrointestinal. En este estudio, las células de *Bifidobacterium infantis* de 24 h de fermentación se inocularon en medios de cultivo con pH iniciales de 7.0, 4.0, 3.0 y 2.0 durante 24 h. Conforme el pH inicial disminuye, la población celular activa disminuyó hasta tres órdenes de magnitud. A pH 4.0 las células se mostraron estables durante las primeras 5 h de fermentación. Además, las células adaptadas a pH ácidos fueron más pequeñas a diferencia de la cepa original. Las cepas adaptadas a pH ácido mostraron un nivel de expresión reducida de dos proteínas de membrana de aproximadamente 18 a 20 kDa.

Palabras clave: *Bifidobacterium*, resistencia ácida, probióticos.

Abstract

Acidity is an environmental condition commonly encountered by bacteria in the gastrointestinal tract and fermented foods. In the present study, *Bifidobacterium infantis* cells were inoculated in culture media with initial pH of 7.0, 4.0, 3.0 and 2.0 respectively for 24 h. As the initial pH decreases, the active cell population decreased to three orders of magnitude. At pH 4.0 the cells were maintained stable during the first 5 h of fermentation. In addition, cells adapted to low pH were smaller than the original strain. The acid pH-adapted strains showed low expression levels of two membrane proteins of approximately 18 to 20 kDa.

Keywords: *Bifidobacterium*, acid resistance, probiotic.

1. Introducción

Las bifidobacterias son habitantes naturales del tracto gastrointestinal (TGI) que representan del 3-10 % en la microflora del adulto y el 90% en los infantes alimentados con leche materna. Este grupo bacteriano tiene un papel vital en el balance microbiano intestinal y en la modulación de la respuesta inmune del huésped. Los efectos de las bifidobacterias de relevancia clínica incluyen la prevención de enfermedades diarreicas y la protección de actividades carcinogénicas en el colon, entre otras (Sanz, 2007). Durante la producción de probióticos o alimentos funcionales con bifidobacterias, la viabilidad de las bacterias se ve

afectada por la acidez del medio de cultivo, los procesos de secado por aspersión en frío, durante su conservación en anaquel y por la presencia de oxígeno en el empaque. De éstos, el ambiente ácido derivado de los procesos de fermentación es el principal factor que limita la viabilidad de las bifidobacterias. Durante el tránsito en el TGI las bifidobacterias deben sobrevivir a las condiciones extremas de acidez en el estómago y a la inmediata presencia de sales biliares del duodeno para asegurar su funcionalidad (Collado y Sanz, 2007; Ventura y col., 2007). El acondicionamiento de bifidobacterias y bacterias lácticas a condiciones de estrés, al final de la fase de crecimiento exponencial o durante la fase estacionaria, permite a las bacterias presentar

* Autor para la correspondencia. E-mail: azaola@correo.xoc.uam.mx
Tel. 5483 7377, Fax 5483 7237

mayor resistencia a condiciones posteriores más extremas (Saarela y col., 2004; Takahashi y col., 2004). Bajo estos tratamientos los microorganismos son capaces de responder a condiciones de estrés, sintetizando una gran variedad de proteínas particulares, las cuales promueven el plegamiento adecuado de ellas, así como el mantenimiento del pH interno por aumento de la actividad de la ATPasa (Wickner y col., 1999; Ventura y col., 2005, 2006, 2007).

El número de bacterias vivas es importante en la funcionalidad de un alimento. No todas las cepas de bifidobacterias pueden usarse industrialmente, debido al bajo rendimiento celular en el medio de cultivo y también por la baja tasa de sobrevivencia a las condiciones de estrés a las que son sometidas durante el proceso. Por lo que la búsqueda de bacterias con características de resistencia a condiciones de estrés es importante en la industria de alimentos por la posibilidad de tener mejores productos, con mayor número de bacterias probióticas viables que les permita un tránsito fácil por el tracto gastrointestinal y llegar a su sitio de acción para colonizar y ejercer su efecto probiótico (Roy, 2005). Estudios a la resistencia al estrés se han realizado durante la fase de crecimiento exponencial, sin embargo, algunos autores reportan que exponer a las células en condiciones de estrés durante la fase estacionaria, que por sí misma es una condición de estrés, se mejora la sobrevivencia de las células cuando son sometidas a condiciones ambientales menos favorables (Takahashi y col., 2004; Saarela y col., 2004). El estudio de los probióticos en los últimos 20 años ha presentado un crecimiento exponencial y se conservan todavía conceptos básicos como el que un probiótico debe ser de origen al que va dirigido su consumo. Sin embargo, las evidencias señalan que deben presentar también la propiedad de adhesividad a la mucosa intestinal para aumentar la posibilidad de que colonice el tracto gastrointestinal, aparte de presentar como característica adicional que resistan al estrés ácido del estómago y la presencia de sales biliares (Del Piano y col., 2006). La búsqueda de cepas probióticas por este procedimiento es invasiva por lo que no es recomendable realizarla. Entonces, el aislamiento de bifidobacterias autóctonas de origen humano junto con el desarrollo de metodologías con el propósito de mejorar su viabilidad en ambientes de estrés ácido, se ha basado en exposiciones cortas de las células a tratamientos en condiciones ácidas, en presencia de jugos gástricos y en sales biliares para inducir la tolerancia al estrés. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad y expresión de proteínas de *B. infantis* bajo condiciones de estrés ácido.

2. Metodología

2.1 Microorganismos

Bifidobacterium infantis ATCC 17930

2.2 Medio de cultivo

Para la activación de las células, la fermentación y cuenta viable se utilizó medio TPY con la siguiente composición (g/L): peptona de caseína (10); peptona de soya (5); extracto de levadura (2.5); glucosa (5); tween 80 (1 ml); cisteína (0.5); K₂HPO₄ (2); MgCl₂ (0.5); ZnSO₄ (0.25); CaCl₂ (0.15); FeCl₃ (0.03). El pH se ajustó a 7.0; 4.0; 3.0 y 2.0 con HCl 1N respectivamente, en frascos de 50 ml conteniendo 40 ml de medio. El oxígeno molecular de los medios de cultivo se eliminó al burbujejar CO₂ por un min. Los frascos fueron sellados con tapones de hule y arillos de aluminio y se esterilizaron a 10 lb por 10 min.

2.3 Activación del microorganismo

Un ml de la cepa *B. infantis* en caldo TPY con glicerol al 30% conservada a -70°C en criovial, fue resuspendido en un frasco vial con 40 ml de medio TPY que se incubó a 39°C con agitación de 150 rpm en una incubadora orbital (Gallenkamp) durante 48 h.

2.4 Fermentaciones

Para la adaptación de la cepa de *B. infantis* a pH ácido, se inocularon 2 ml de la cepa activada en un vial de 40 ml de medio TPY pH 7.0, 39°C y 150 rpm (Gallenkamp), se tomaron muestras cada 2 h hasta que el medio de cultivo alcanzó pH de 4. Estas células a pH ácido se lavaron en solución salina al 0.85 % estéril y se inocularon (10 %) a los viales de 40 ml con medio TPY a pH 4.0, 3.0 y 2.0. Se tomaron muestras de cada frasco a diferentes tiempos hasta las 24 h.

2.5 Determinación de biomasa y pH

Las muestras de fermentación se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C y el paquete celular se resuspendió en agua destilada. La densidad óptica se leyó a 600 nm (Cary 50 UV-visible Spectrophotometer, Varian) la biomasa se leyó con base a una curva estándar previamente realizada de DO vs peso seco. Al sobrenadante se le determinó el pH.

2.6 Cuenta viable

Se utilizó el método de diluciones decimales y 100 µl de las distintas diluciones se sembraron por dispersión en placas con agar MRS. Las placas inoculadas se incubaron en una cámara anaeróbica

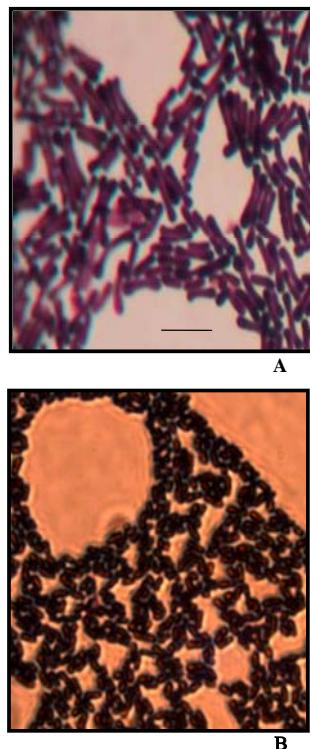


Fig. 1. Morfología celular de un cultivo *B. infantis* crecida en fase estacionaria a pH 7.0 (A) y 2.0 (B).

(Forma Scientific, USA) con una atmósfera de 10% CO₂, 5% H₂ y 80% N₂. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

2.7 Electroforesis

La liberación de proteínas de la membrana exterior se realizó de acuerdo a Pluger y col., (2007) y fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Se agregó 1 ml de cultivo conteniendo 1.94 µg de células (peso seco) se agregaron a 200 µl de amortiguador de carga (10% glicerol, 40 mM glicina, 5 Mm Tris pH 8.9 y 0.005% p/v de azul de bromofenol). Se cargaron 10 µl de esta suspensión en el gel (11% de poliacrilamida) y se le aplicó un impulso eléctrico de 12.5 mA por 35 min a 4°C, para liberar proteínas de las células. En ese momento se cargaron 8 µl de marcador (Dual Color Bio Rad, 10-250 kDa) y se corrió el gel bajo condiciones normales. El gel se reveló con azul de Coomassie.

3. Resultados y discusión

El éxito de productos alimenticios con bacterias probióticas depende de que estas puedan resistir las condiciones de estrés tecnológico como son el pH ácido de la fermentación, los procesos de secado con calor para la producción de polvos de fermentación y durante la vida de anaquel y posteriormente a las condiciones de estrés fisiológico, como el pH ácido

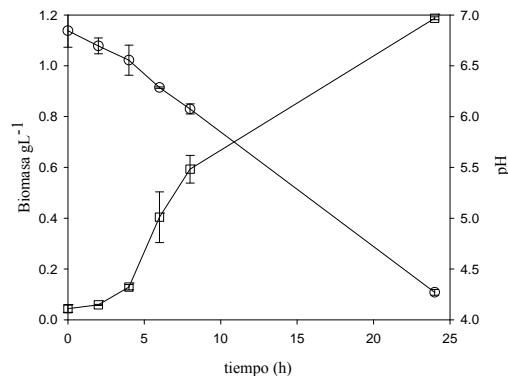


Fig. 2. Crecimiento y cambio de pH de *B. infantis* durante la fermentación para la obtención de biomasa.

del estómago y la presencia de sales biliares. La resistencia del mayor número de células es necesaria para alcanzar su sitio de acción en número suficiente que les permita ejercer su efecto funcional. Muchos mecanismos de adaptación a condiciones de estrés han sido estudiados, uno de ellos es la modificación en la membrana celular (Sánchez y col., 2007). En la Fig. 1 se muestran los cambios morfológicos de *B. infantis* bajo las diferentes condiciones de acidez. Cuando *B. infantis* creció a pH 7.0 mostró la morfología característica de bacilos Gram positivos, pleomórficos y largos (Fig. 1A). Al ser sometido a condiciones ácidas su morfología cambió a bacilos cortos (Fig. 1B). Esto probablemente se debe a los cambios en el perfil de ácidos grasos en respuesta a la caída de pH, y a la alteración en la deficiencia de los polímeros aniónicos y a la permeabilidad relativa de protones a través de su translocación (Cotter y Hill, 2003; Fozo y Quivey, 2004).

3.1 Crecimiento y tolerancia ácida

Para la adaptación a las distintas condiciones de acidez, se realizó una primera fermentación de 24 h, donde llegó a un pH de 4.0, y con un crecimiento alto de biomasa (Fig. 2). A partir de estos resultados se realizó otra nueva fermentación bajo las mismas condiciones y la biomasa obtenida a las 24 h sirvió para inocular a los medios ajustados a pH de 7.0, 4.0, 3.0 y 2.0. En la Fig. 3A, se muestran los resultados de esta segunda fermentación, donde es importante observar que en la fermentación con pH inicial de 7.0, disminuyó a pH 5.0 después de 24 h, que a diferencia con los medios ajustados a pH inicial ácidos, no se observó una disminución significativa en el cambio de la acidez inicial. Estos resultados concuerdan con los reportados por Saarela y col., (2004); Takahashi y col., (2004) y Sánchez y col., (2007) donde encuentran que después de exponer a las bacterias a condiciones de estrés, se mejora la respuesta de las bacterias a las mismas condiciones de estrés a las que fueron sometidas con anterioridad. En la Fig. 3B se muestran los perfiles de biomasa

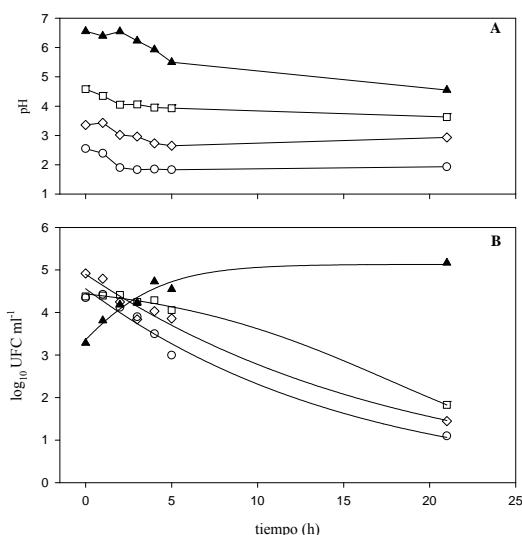


Fig. 3. Perfil cinético de pH y células viables (\log_{10} UFC ml^{-1}) de *B. infantis* de las fermentaciones realizadas a pH 7.0 (\blacktriangle), pH 4.0 (\square), pH 3.0 (\diamond) y pH 2.0 (\circ). Los inóculos de estas fermentaciones se hicieron con células en estado estacionario provenientes de la fermentación previa.

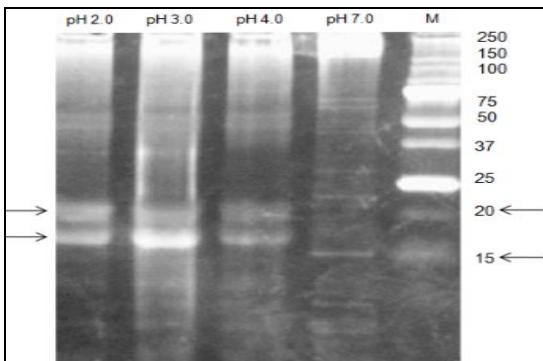


Fig. 4. Análisis electroforético del perfil proteico de *B. infantis* crecido en fase estacionaria a diferentes pH. Las flechas indican la posición de proteínas con los diferentes niveles de expresión entre la bacteria crecida a pH 2.0, 3.0, 4.0 y 7.0. M = Marcador de peso molecular en kDa.

activa a las diferentes condiciones de acidez inicial. La viabilidad de *B. infantis* a pH 7.0 se incrementó hasta 2 órdenes de magnitud durante 24 h con respecto a la viabilidad observada a los pH ácidos. La viabilidad de *B. infantis* a pH 4.0 y 3.0 muestra que la biomasa activa se mantuvo relativamente estable durante las primeras 5 h, posteriormente se observó una disminución de hasta 3 órdenes de magnitud, debido a la acidez de los medios. A pH inicial de 2, desde el inicio de la fermentación, la cuenta de células activas disminuyó significativamente. La capacidad individual de las bifidobacterias a sobrevivir en condiciones ácidas depende de la especie y su origen. Matsumoto y col.,

(2004) reportaron que la tolerancia ácida de *B. longum* y *B. adolescentis* fue muy limitada, ya que mostraron una disminución muy considerable en su viabilidad después de 1 h de incubación a pH 3.0. Excepto a *B. animalis* subespecie *lactis* el cual se mantuvo viable durante 3 h a pH ácido. Charteris y col., (1998) observaron en *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. infantis* y *B. breve* una resistencia a condiciones ácidas por 90 min. Muchos de estos reportes se han basado sobre exposiciones cortas de bifidobacterias a condiciones de estrés subletales pero no se reportó si se mostró una mejoría en la tolerancia a ambientes ácidos en tiempos prolongados. Cuando las bacterias son expuestas a condiciones ácidas, el pH homeostático se mantiene al liberar H⁺ de la célula (Booth, 1985). Además este proceso es dependiente de la actividad de ATPasa, enzima responsable para mantener la concentración de H⁺ entre la célula y el ambiente (Matsumoto y col., 2004, Saarela y col., 2004).

3.2 Perfil proteico.

Bajo condiciones de estrés, *E. coli* presenta cambios en la estructura y composición de lípidos y proteínas de la membrana, que afectan sus características físicas y químicas (Lesley y col., 2002), así como también se activa la producción y secreción de chaperoninas y proteasas que intervienen para estabilizar o remover a las proteínas de membrana (Ami y col., 2009). Por lo tanto, las posibles alteraciones de la composición de proteínas de membrana durante la adaptación ácida de *B. infantis* fueron examinadas por electroforesis no desnaturalizante. En la Fig. 4, se observan dos bandas abundantes e intensas de aproximadamente 18 a 20 kDa que se presentaron cuando *B. infantis* creció en condiciones ácidas. Estas bandas prevalecieron cuando el microorganismo se mantuvo creciendo a pH 4.0, 3.0 y 2.0. Probablemente, la resistencia ácida adquirida de *B. infantis* resultó de un incremento en la cantidad de proteínas en condiciones ácidas, en comparación con las células que iniciaron a pH 7.0, que no muestran estas bandas. Este es el primer reporte sobre la presencia de este tipo de banda con bifidobacterias cuando se encuentran en condiciones de estrés ácido. El requerimiento de la síntesis de proteínas durante el estrés, indica que el nivel de proteínas se debe de incrementar para conferir resistencia al estrés ácido (Raja y col., 1991). Además, esta síntesis de proteínas, probablemente ayudó a mantener la homeostasis de pH intracelular, protegiendo a la bacteria de estas condiciones extremas. Las cepas tolerantes a la acidez, también han mostrado tolerancia a otros estrés ambientales (sales biliares y temperatura), sugiriendo el desarrollo de mecanismos de protección cruzada. Estudios previos han demostrado asociaciones entre tolerancia ácida, temperaturas y concentraciones de sales biliares en bifidobacterias (Schmidt y Zink, 2000; Saarela y col., 2004). Ventura y col., (2006) reportaron que cuando

las bifidobacterias son sometidas a condiciones de estrés térmico, se induce la expresión de proteínas de pesos moleculares pequeños. Estas proteínas, también funcionan en el plegamiento de proteínas para su buen funcionamiento, además previenen la desnaturalización de las mismas, cuando las bacterias son sometidas a estrés (Lee y col., 1997). Foster (1991) reportó estas proteínas como chaperoninas, incluidas en la protección a la desnaturalización ácida de otras proteínas en *Salmonella typhimurium*. Parece posible que la adquisición a la tolerancia al ácido puede estar mediada por el incremento en los niveles de expresión de algunas proteínas de membrana. Estos cambios pueden también afectar a otras propiedades celulares que mostró *B. infantis* cuando creció a pH 7.0 y en condiciones ácidas, tal como la morfología que a pH de 7.0 aparecen como células normales (Fig. 1A) y en condiciones ácidas son células regulares pero pequeñas (Fig. 1B). Margolles y col., (2003) reportaron cambios morfológicos en *B. bifidum* cuando adquirió resistencia a las sales biliares.

La sobrevivencia de bifidobacterias a las condiciones de acidez varía entre especies y cepas. Berrada y col. (1991) determinaron en pruebas *in vitro* que simulaban el jugo gástrico, el crecimiento de dos cepas comerciales de bifidobacterias; una fue inhibida en 0.5 unidades logarítmicas mientras para la otra cepa, el crecimiento declinó hasta en 4 unidades logarítmicas. En un modelo experimental de simulación del tracto gastrointestinal, *B. bifidum* mostró ser tolerante a la acidez cuando el pH disminuyó de 5.0 a 1.8 en un período de 80 min, con un 20% de disminución en la biomasa activa (Marteau y col., 1997). Sin embargo, la biomasa activa de *B. animalis* subps. *lactis* permaneció sin cambio a pH 3.0 durante 180 min, declinando lentamente a pH 2.0 y hasta cero a pH de 1.0 en 60 min (Pochart y col., 1992). Charteris y col., (1998) reportaron cepas de bifidobacterias resistentes a la acidez cuando el jugo gástrico simulado fue adicionado de proteína de leche y mucina ya que estos ejercieron capacidad amortiguadora. Por lo que la resistencia a la acidez depende del pH y el tiempo de exposición (Bezkorovainy, 2001).

Referencias

- Ami, D., Natalello, A., Schultz, T., Gatti-Lafranconi, P., Lotti, M., Doglia, S.M. y de Marco, A. (2009). Effects of recombinant protein misfolding and aggregation on bacterial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794, 263–269.
- Berrada, N., Lemeland, J., Laroche, G., Thouvenot, P. y Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science* 74, 409–413.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 399S–405S.
- Booth, I.R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 49, 359–378.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morell, L. y Collins, J.K. (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84, 759–768.
- Collado, C.M., y Sanz, Y. (2007). Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1147–1157.
- Cotter, P.D. y Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 429–453.
- Foster, J.W. (1991). *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *The Journal of Bacteriology* 173, 6896–6902.
- Fozo, E.M. y Quivey, R.G. (2004). Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus* mutants enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 929–936.
- Lee, J., Roseman, A., Saibil, R., y Vierling, E. (1997). A small heat shock protein stably binds heat denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. *The EMBO Journal* 16, 659–671.
- Lesley, A. S., Graziano, J., Cho, Y., Knuth, W.M. y Klock, E.H. (2002). Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Protein Engineering* 15, 153–160.
- Margolles, A., García, L., Sanchez, B., Gueimonde, M. y de los Reyes Gavilán, C. (2003). Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholate – A preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 82, 191–198.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. y Huis in't Veld J.H. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science* 80, 1031–1037.
- Matsumoto, M., Ohishi, H. y Benno, Y. (2004). H-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 93, 109–113.
- Del Piano, M., Morelli, M., Strozzi, G.P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballarà, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garello, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M. y Capurso, L. (2006). Probiotics: from

- research to consumer. *Digestive and Liver Disease* 38, s248-s255.
- Pluger, K., Bartola, I., Velásquez, F., y Lorenzo V. (2007). Non-disruptive release of *Pseudomonas putida* proteins by *in situ* electric breakdown of intact cells. *Journal of Microbiological Methods* 71, 179-185.
- Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P. y Rambaud, J.C. (1992). Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. *American Journal of Clinical Nutrition* 55, 78-80.
- Raja, N., Goodson, M., Chui, W.C.M., Smith, D.G. y Rowbury, R. J. (1991). Habituation to acid in *Escherichia coli*: conditions for habituation and its effects on plasmid transfer. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 59-65.
- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy foods. *Lait* 85, 39-56.
- Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajarvi, I. y Matto, J. (2004). Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1205-1214.
- Sánchez, B., Champomier-Verge, M.C., Collado, M., Anglade, P., Baraige, B., Sanz, Y., Reyes-Gavilán, C., Margolles, A. y Zagoreci, M. (2007). Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6450-6459.
- Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal* 17, 1284-1289.
- Schmidt, G. y Zink, R. (2000). Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. *International Journal of Food Microbiology* 55, 41-45.
- Takahashi, N., Xiao, J., Miyaji, K., Yaeshiima, T., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S. y Hosono, A. (2004). Selection of an acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal Dairy Research* 71, 340-345.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Fitzgerald, F. G. y van Sinderen, D. (2007). Molecular characterization of *hsp20*, encoding a small heat shock protein of *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4695-4703.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Vernini, V., Fitzgerald, F. y van Sinderen, D. (2006). How high G+C Gram positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 734-759.
- Ventura, M., Keny, G. J., Zhang, Z., Fitzgerald, F. y van Sinderen, D. (2005). The *clpB* gene of *Bifidobacterium breve* UCC 2003: transcriptional analysis and first insights into stress induction. *Microbiology* 151, 2861-2872.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. y Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286, 1888-1893.