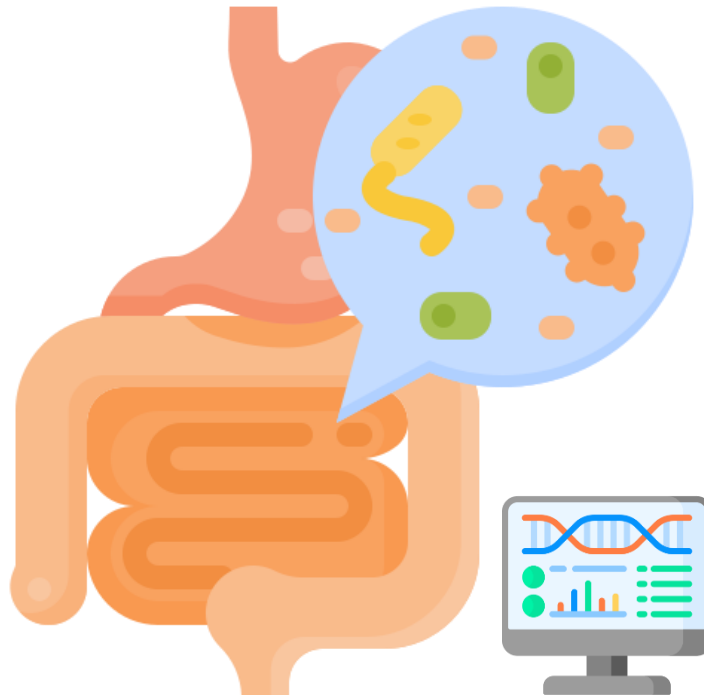


# IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS PER LA CLASSIFICACIÓ GENÒMICA DELS PROBIÒTICS

Andrea Pignatelli Espejo

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



**Tutor acadèmic:** Dr. Pere Puigbò Avalos, departament de Bioquímica i Biotecnologia.

**En cooperació amb:** Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya.

**Supervisor:** Dr. Pere Puigbò Avalos, Eurecat, Centre Tecnològic de Catalunya, [pere.puigbo@eurecat.org](mailto:pere.puigbo@eurecat.org)

Data de convocatòria: Juny de 2023

# CONFIDENCIALITAT

---

Aquest Treball de Fi de Grau és de caràcter confidencial i propietat exclusiva del centre Eurecat (Av. de la Universitat, 1, 43204 Reus, Tarragona). La informació continguda assenyalada com a tal, està destinada únicament per a ús intern i confidencial de l'entitat propietària. Qualsevol persona que tingui accés a aquest document ha de tractar-lo amb la deguda confidencialitat i protegir-lo de qualsevol divulgació no autoritzada.



En ser aquesta la versió reduïda, quan aparegui la icona s'oferirà una breu explicació de les dades que apareixen en la versió íntegra.

## AGRAÏMENTS

---

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies als professors del grau de Biotecnologia que he tingut durant els darrers anys, que han compartit els seus coneixements i han contribuït al meu desenvolupament com a professional.

També al meu tutor de pràctiques i supervisor: Dr. Pere Puigbò Avalos, que em va guiar durant totes les pràctiques i redacció del TFG. I al centre Eurecat per obrir-me les portes de les seves instal·lacions i permetre'm fer aquest treball.


Per últim, agrair a la meva família i amics, sobretot als meus pares que han donat tot per mi i s'han esforçat molt per tal que jo aconseguís el que em proposés.

## DETECCIÓ DE PLAGI

---

Jo, **Andrea Pignatelli Espejo**, amb DNI **49319747-L**, soc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de juny de 2023



# ÍNDEX

---

<b>DADES DEL CENTRE</b>	<b>6</b>
Missió i objectius	6
Instal·lacions	7
Organització	7
Finançament	7
Processos que es realitzen	7
<b>RESUM I PARAULES CLAU</b>	<b>8</b>
Paraules clau	8
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>9</b>
Definició general dels probiòtics	9
Mecanismes d'acció	9
Exemples de l'ús de probiòtics en diferents malalties	12
Síndrome de l'intestí irritable (IBS)	12
Malalties cardiovasculars (CVD)	13
Punt crític i proposta de solució	14
<b>HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS</b>	<b>14</b>
Hipòtesis	14
Objectius	14
<b>METODOLOGIA</b>	<b>15</b>
Base de dades COG	15
Anàlisi de la distribució de proteïnes de la base de dades COG	17
Cerca literària de proteïnes i puntuació segons el seu potencial com a probiòtic	17

<b>RESULTATS, DISCUSSIÓ I RELACIÓ AMB ELS OBJECTIUS PLANTEJATS</b>	<b>19</b>
<b>Resultats de la cerca bibliogràfica segons el potencial probiòtic</b>	<b>19</b>
<b>Freqüència de cada categoria COG en funció de la seva classificació</b>	<b>19</b>
Exemple de distribució dels COGs en una soca probiòtica coneguda	20
<b>Discussió</b>	<b>22</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>23</b>
Perspectives de futur	23
<b>BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA</b>	<b>24</b>
<b>AUTOAVALUACIÓ</b>	<b>41</b>
<b>ANNEXOS</b>	<b>41</b>
Annex 1: Categories de la base de dades COG	41
Annex II: Codi Python	42
Annex III: Taules de les tres categories amb COG classificats com a 2	43

## DADES DEL CENTRE

---

### *EURECAT – CENTRE TECNOLÒGIC DE CATALUNYA*

Departament de Nutrició i Salut (UTNS)  
Av. de la Universitat, 1, 43204 Reus, Tarragona  
Projecte MICROBIOTA

### **Missió i objectius**

La Fundació **Eurecat** té per objectius principals:

- Impuls de la innovació en general i d'R+D, en tots els sectors d'activitat.
- Impuls de la recerca industrial i el desenvolupament tecnològic.
- Impuls de la recerca en general.
- Impuls de l'emprenedoria en general i en especial de l'emprenedoria tecnològica.
- Impuls del creixement empresarial.
- Impuls de la internacionalització basada en innovació.
- Impuls del desplegament de talent tecnològic i de negoci.
- Impuls de la formació en els àmbits propis de l'objecte fundacional.
- Impuls de la transferència tecnològica i de coneixement.
- Afavoriment del desenvolupament territorial.
- Afavoriment de l'increment de la cultura científic-tecnològica.

Concretament, la missió de la **UTNS** (Unitat de Nutrició i Salut) és promoure la innovació, realitzar serveis tecnològics i facilitar la transferència de tecnologia en l'àmbit de la nutrició i la salut. Tenint per objectiu principal incrementar la competitivitat de la indústria agroalimentària espanyola.

## Instal·lacions

**Eurecat** compta amb 12 seus corporatives repartides entre Espanya i l'Amèrica del Sud, no obstant té una presència internacional arreu del món.

El **Departament de Nutrició i Salut** ubicat a Reus, presenta instal·lacions i equiptaments punters que permeten el desenvolupament d'investigacions *in silico*, *in vitro* i *in vivo*. També compta amb estudis d'intervenció nutricional en humans per al desenvolupament d'aliments funcionals, i compostos bioactius i nutracèutics.

## Organització

Es divideix en 4 àmbits de coneixement: industrial, digital, de sostenibilitat i biotecnològic. El darrer es desglossa en: ciències òmiques, i nutrició i salut que és on es van realitzar les pràctiques. També consta de diversos sectors, alguns exemples són: aeronàutic, construcció, salut, química...

## Finançament

És una fundació privada constituïda per temps indefinit sota la denominació de Fundació Privada Alira en data 23 de desembre del 2013. Subjecta al Llibre Tercer del Codi Civil de Catalunya, està inscrita al Registre de Fundacions de la Generalitat de Catalunya amb el número 2826.

## Processos que es realitzen

Actualment, el centre està treballant tant en l'àmbit nacional com europeu.

Entre els projectes nacionals es troba el projecte **MICROBIOTA**. Aquest, es basa en la identificació de nous ingredients moduladors de la microbiota humana i animal fent ús de la biotecnologia industrial, les tecnologies òmiques i les tecnologies de *big data*. En aquest context, es desenvolupa la present memòria.

## RESUM I PARAULES CLAU

---

*Durant els darrers anys, l'ús dels probiòtics per a diferents aplicacions ha experimentat un increment a escala global. Aquest fet ha creat la necessitat d'aprofundir els coneixements base que es tenen sobre els seus mecanismes d'acció. En concret identificar aquelles proteïnes que fan possible que un bacteri tingui activitat probiòtica, o pel contrari aquelles que resultin perjudicials. La identificació ofereix la possibilitat de crear una classificació genòmica d'aquests bacteris en funció del seu potencial probiòtic. En aquest treball, s'han utilitzat genomes completament seqüenciats per la identificació de biomarcadors proteics.*

*Durant el transcurs de la memòria, es relataran els passos que s'han dut a terme per aconseguir aquesta classificació: passant per una aproximació bioinformàtica, una cerca exhaustiva manual de la literatura, i una classificació numèrica de les proteïnes segons el seu efecte potencial (positiu o negatiu) en soques probiòtiques.*

*Com a resultat, s'han pogut identificar aquelles proteïnes que permeten als bacteris probiòtics realitzar els seus mecanismes d'acció. Aquests, s'han agrupat en categories segons la seva funció, obrint pas a futurs estudis quantitius on s'utilitzin aquestes proteïnes com a biomarcadors de probiòtics.*

*Els resultats d'aquest treball permeten aprofundir el coneixement sobre el genoma dels probiòtics, així com a futures aplicacions d'aquests bacteris.*

### Paraules clau

*Bacteris, Microbiota, Probiòtics, Potencial probiòtic, Biomarcadors proteics, Lactobacillus, Bifidobacterium*

# INTRODUCCIÓ

---

## Definició general dels probiòtics

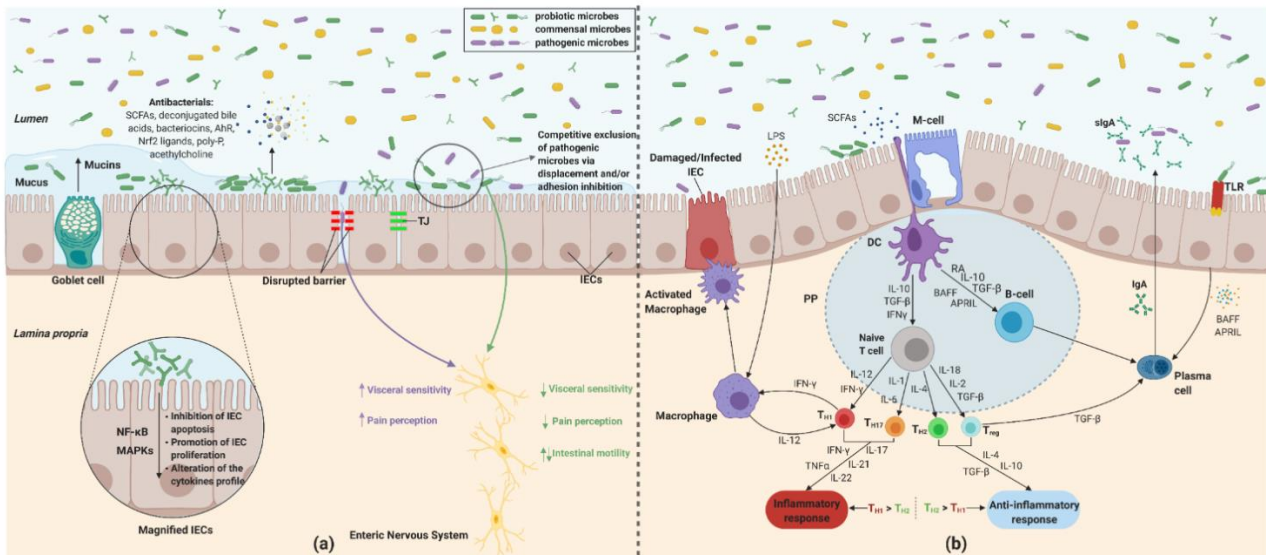
Segons l'organització del menjar i l'agricultura (FAO) de les Nacions Unides i l'Organització de la salut mundial (WHO), els **probiòtics** són organismes vius que quan s'administren en dosis concretes proporcionen un benefici en l'hoste ([Hill et al. 2014](#)). Encara que aquesta memòria se centra en bacteris probiòtics, el terme general engloba també a llevats, com *S. Cerevisiae* ([Sun et al. 2021](#)) o *S. Boulardii*. ([Pais et al. 2020](#))

Inicialment, es creia que els seus efectes estaven relacionats únicament amb la interacció amb la microbiota intestinal. No obstant això, a mesura que avançava el coneixement d'aquests organismes, es va allunyar aquesta idea més elemental, i es va substituir pel pensament que tenen més potencial del que inicialment es va considerar.

El **potencial probiòtic** es defineix, en aquest treball, com la capacitat que tenen els organismes per exercir beneficis a l'hoste. Aquest mateix concepte es pot traslladar al camp de la genòmica, on el potencial probiòtic serien aquelles proteïnes que permeten a, per exemple, un bacteri ser considerat una soca probiòtica.

## Mecanismes d'acció

La [Figura 1](#) mostra els mecanismes d'acció de diverses soques de probiòtics. Els estudis d'aquests organismes no se centren únicament en models humans, per tant, no és d'estranyar que no tots aquests processos s'hagin descrit en ells, ni totes les soques tinguin aquestes capacitats. D'igual manera, a l'interior cel·lular intervenen molts més factors, per tant, aquests mecanismes dependran també d'elements propis de l'hoste.



**Fig 1:** Esquema d'alguns dels mecanismes d'acció dels probiòtics a la microbiota (Simon et al. 2021). Obra subjecta a llicència general *Creative Commons* <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

A la part (a) de la Figura 1, es poden observar els efectes dels probiòtics sobre l'epiteli intestinal i el sistema nerviós. Els probiòtics interaccionen amb la microbiota intestinal principalment per competició pels nutrients i espai de possibles patògens, incrementant la seva estabilitat i provocant una resistència a la colonització (Collado et al. 2006).

Moltes soques s'han relacionat amb efectes antagònics contra altres microorganismes que no formen part de la microbiota, principalment per la producció de bacteriocines. Aquests compostos tenen propietats antimicrobianes que ajuden a la microbiota a impedir el pas de possibles patògens (WoldemariamYohannes et al. 2020).

També presenten efectes de *cross-feeding*, un mecanisme on el producte metabòlic d'una soca és metabolitzat per una altra (Smith et al. 2019). Un exemple es dona en els Bifidobacteris, importants en el còlon humà. Els bacteris produeixen acetat o lactat durant la fermentació de carbohidrats, substrats que poden utilitzar altres soques per produir butirat (Rivière et al. 2016). La producció de butirat i d'altres àcids grassos de cadena curta (SCFA), té efectes protectors, sobretot a l'hora d'interaccionar amb el sistema immunitari (Dalile et al. 2019).

També presenten funcions fisiològiques, com l'estimulació de l'epiteli intestinal mitjançant l'increment de l'expressió de *tight junction*, i la producció de mucines, reduint l'ancoratge dels patògens a les cèl·lules epitelials ([Ahmadi et al. 2020](#)).

Els bacteris probiòtics poden sintetitzar molècules petites amb efectes sistèmics o locals; un exemple de la seva síntesi es dona amb la producció de neuroquímics com l'oxitocina, serotonina, noradrenalina o la dopamina. Aquests compostos afecten funcions cerebrals, donant un efecte sistèmic ([Sherwin et al. 2018](#)).

També estan relacionades amb la producció d'enzims, per exemple la  $\beta$ -galactosidasa i la hidrolasa de les sals biliars. Aquests enzims milloren la digestió de la lactosa i els nivells de lípids en sang en humans respectivament. Un exemple es dona en *Streptococcus thermophilus*, on la producció de  $\beta$ -galactosidasa desglossa en glucosa i galactosa les molècules de lactosa, permetent una millor digestió ([Amato et al. 2022](#)).

En la segona part de la imatge **(b)**, s'observen els efectes dels probiòtics sobre el sistema immune. Un exemple és la ja esmentada producció de SCFA per *cross-feeding*. També activen les cèl·lules dendrítiques, fent que les cèl·lules T es diferenciïn i s'estimuli la producció de citocines i d'IgA. Els probiòtics poden arribar a alterar l'equilibri entre Th1/Th2 modificant les citocines pro i antiinflamatòries, podent dirigir la situació cap a una no inflamatòria (inhibició de Th1), o proinflamatòria (diferenciació cap a Th1) ([Shida et al. 2002](#)).

Aquests són alguns dels mecanismes d'acció que tenen els probiòtics tant a escala intestinal com sistèmic. Com es pot observar la majoria de rutes estan relacionades entre elles, podent donar efectes sinèrgics.

## Exemples de l'ús de probiòtics en diferents malalties

### Síndrome de l'intestí irritable (IBS)

La síndrome de l'intestí irritable és una malaltia crònica gastrointestinal, amb una incidència del 9% i 16% de la població general, amb major afectació en dones (12% vs. 8,6%) ([Oka et al. 2020](#)). Els símptomes més característics són: malestar abdominal, inflamació, i canvis en el patró de defecació que classifiquen IBS en 4 categories segons el criteri *Rome IV* ([Bonetto et al. 2021](#)):

- IBS-C: IBS amb estrenyiment
- IBS-D: IBS amb diarrea
- IBS-M; IBS amb estrenyiment i diarrea
- IBS sense classificar

Al tracte gastrointestinal habiten una gran població de bacteris comensals, una disbiosi entre ells podria significar una funció anormal d'aquest tracte, podent provocar aquesta malaltia. En la majoria dels casos d'IBS, es troba una menor biodiversitat en bacteris comensals i un augment en espècies patogèniques ([Ki Cha et al. 2012](#)).

Actualment, aquells pacients diagnosticats amb IBS presenten un tractament farmacològic, que inclou antibiòtics i laxants, i no farmacològic relacionat amb la dieta, que dependran del subtipus.

El possible tractament d'aquesta malaltia amb probiòtics ja ha estat posat a prova en diverses metaanàlisis ([Zhang et al. 2022](#)) ([Ford et al. 2018](#)). Aquests, tracten de restaurar la barrera microbiana malmesa amb suplementació probiòtica que conté els bacteris necessaris en cada pacient.

Avui en dia, hi ha estudis en l'àmbit clínic amb resultats esperançadors. Això no obstant, cal un millor coneixement dels bacteris amb capacitats probiòtiques per a obtenir resultats completament satisfactoris.

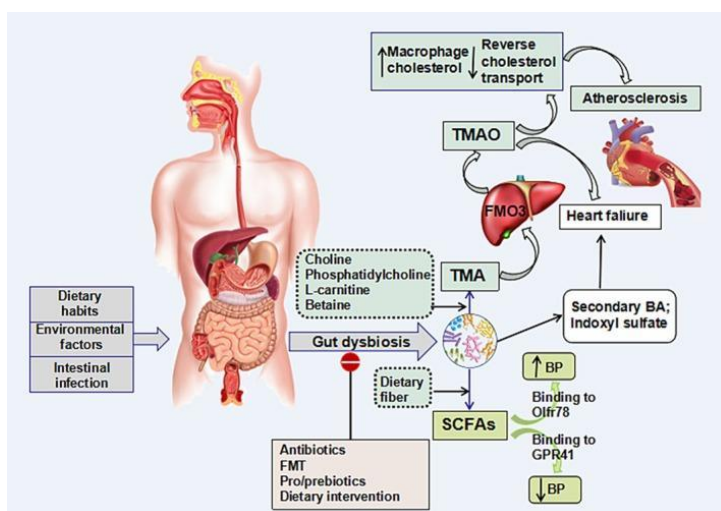


## Malalties cardiovasculars (CVD)

Les malalties cardiovasculars o CVD, continuen liderant la llista de causa principal de mort en ciutadans estatunidencs segons *American Heart Association* (Tsao et al. 2022). La majoria d'elles, venen determinades per un increment del contingut lipídic dins de les artèries (arterioesclerosi), i un increment de la formació de trombus, afectant òrgans com el cervell, cor, fetge i ulls (Weber i Noels 2011).

Recentment, s'ha relacionat la microbiota intestinal i CVD en diversos estudis metagenòmics (Jie et al. 2017) (Liu et al. 2020). En aquests, s'han identificat possibles probiòtics candidats per ser usats com a *targets* terapèutics. Se sap que CVD és principalment causat per hàbits alimentaris i factors ambientals, podent arribar a causar una disbiosi i inflamació que pot promoure el desenvolupament d'aquestes malalties (Jin et al. 2019).

Com es pot observar a la Figura 2, la disbiosi genera TMA que en oxidar-se dona TMAO. Aquesta trimetilamina N-òxid es considera dels factors causants de l'ateroesclerosi i la parada cardíaca (Wang et al. 2011). La disbiosi també promou la síntesi d'àcid biliar i indoxil sulfat que també s'associen amb la fallada cardíaca (Dantzer et al. 2018) (Wu et al. 2016). Per últim, els darrers estudis han demostrat com els SCFA sintetitzats per probiòtics ajuden a regular la pressió sanguínia en unir-se als receptors de proteïnes G: Olfr78 i GPR4 (Marques et al. 2017).



**Fig 2:** Esquema del paper de la microbiota intestinal en malalties cardiovasculars (Jin et al. 2019). Obra subjecta a llicència general Creative Commons

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## Punt crític i proposta de solució

Els resultats sobre els estudis mencionats anteriorment, encara que prometedors, no aporten la informació necessària per desenvolupar teràpies efectives basades en probiòtics contra aquestes malalties. És més, encara no hi ha cap mètode que permeti discernir els mecanismes moleculars dels probiòtics existents.

Aquest fet augmenta la necessitat d'aprofundir en l'anàlisi bioinformàtic i genòmic, amb la finalitat d'ajudar als investigadors a estudiar millor la composició de la microbiota intestinal, i els probiòtics que exerceixen efectes beneficiosos sobre ella.

En aquesta memòria es descriuen els primers passos d'una proposta de solució a aquest punt crític, establint una classificació basada en marcadors proteics a partir de genomes completament seqüenciats, que permeten identificar els bacteris relacionats segons el seu potencial probiòtic.

# HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS

---

## Hipòtesis

El potencial probiòtic d'un bacteri es pot identificar i classificar a partir del seu genoma.

## Objectius

- Definició del terme probiòtic a partir de la seva composició molecular.
- Identificació a la literatura dels biomarcadors proteics que defineixen als probiòtics.
- Desenvolupament d'una puntuació segons el potencial probiòtic, i classificació funcional de les proteïnes.
- Determinació de les categories funcionals amb major activitat probiòtica.

# METODOLOGIA

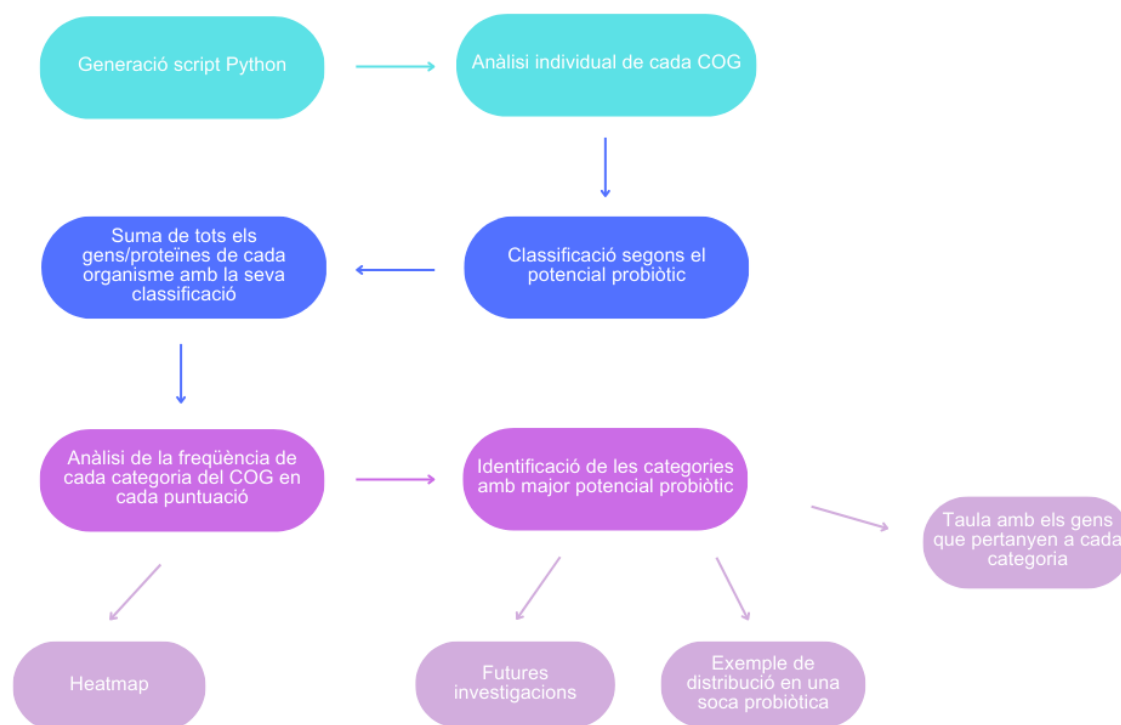


Fig 3: Diagrama de flux de la metodologia emprada en aquest treball.

## Base de dades COG

La base de dades de Clústers de Gens Ortòlegs (COGs; en anglès, *Clusters of Orthologous Groups*), es defineix com una eina per la classificació filogenètica de proteïnes de genomes microbians ([Tatusov et al. 1997](#)). Actualment, compta amb 4.877 COGs, 37 categories taxonòmiques, 1.309 organismes, i 3.213.255 ID de proteïnes ([Galperin et al. 2021](#)). L'objectiu principal d'aquesta base de dades és classificar proteïnes ortòlogues en genomes completament seqüenciats.

Tradicionalment, l'anotació de proteïnes en genomes seqüenciats ha estat a càrrec d'eines com BLASTP ([Altschul et al. 1997](#)), on se cerquen seqüències similars en bases de dades i s'escull la que més s'assembli (*best hit*). Tot i això, el seu ús pot estar limitat a causa de la funció *best hit*, ja que sovint comporta que el resultat sigui "sense caracteritzar" o "putativa" encara que hi hagi un

homòleg amb funció coneguda. Un altre desavantatge és que a vegades les diferències entre dominis arquitectònics de proteïnes homòlogues poden resultar en una classificació errònia.

Aquests punts dèbils han fet que sorgeixin d'altres elaborades a partir de bases de dades anotades de seqüències de proteïnes. Entre aquestes eines trobem UniProt ([UniProt Consortium 2023](#)), PANTHER ([Thomas et al. 2022](#)), i la ja mencionada COGs.

Una característica que s'ha utilitzat per desenvolupar aquest projecte i que la diferencia d'altres aproximacions, és que un COG només té dues possibilitats: pertànyer o no a un organisme. Això fa possible crear matrius basades en representacions de si/no (1 o 0), per tal de simplificar la tasca de la classificació de genomes microbians, i la seva reconstrucció en l'evolució.

Un altre aspecte que s'utilitzarà en la memòria, és la classificació segons funció que ofereix la mateixa base de dades. Els diferents COGs s'agrupen en lletres segons el paper que tinguin en diferents processos, per exemple la K representa les proteïnes implicades en processos de transcripció, i la N motilitat cel·lular \*. Aquesta categorització facilita la tasca d'agrupar aquells que tinguin major potencial probiòtic.

Els trets que s'han comentat sobre la base de dades COGs fan que, en aquest cas, sigui l'aproximació més útil a l'hora de desenvolupar el projecte.

\*Classificació completa a Annex I.

## Anàlisi de la distribució de proteïnes de la base de dades COG

El primer pas és la creació d'un script de Python\* que generi una taula amb les dades necessàries per a realitzar la cerca. Aquesta informació s'extreu directament de la base de dades COG.

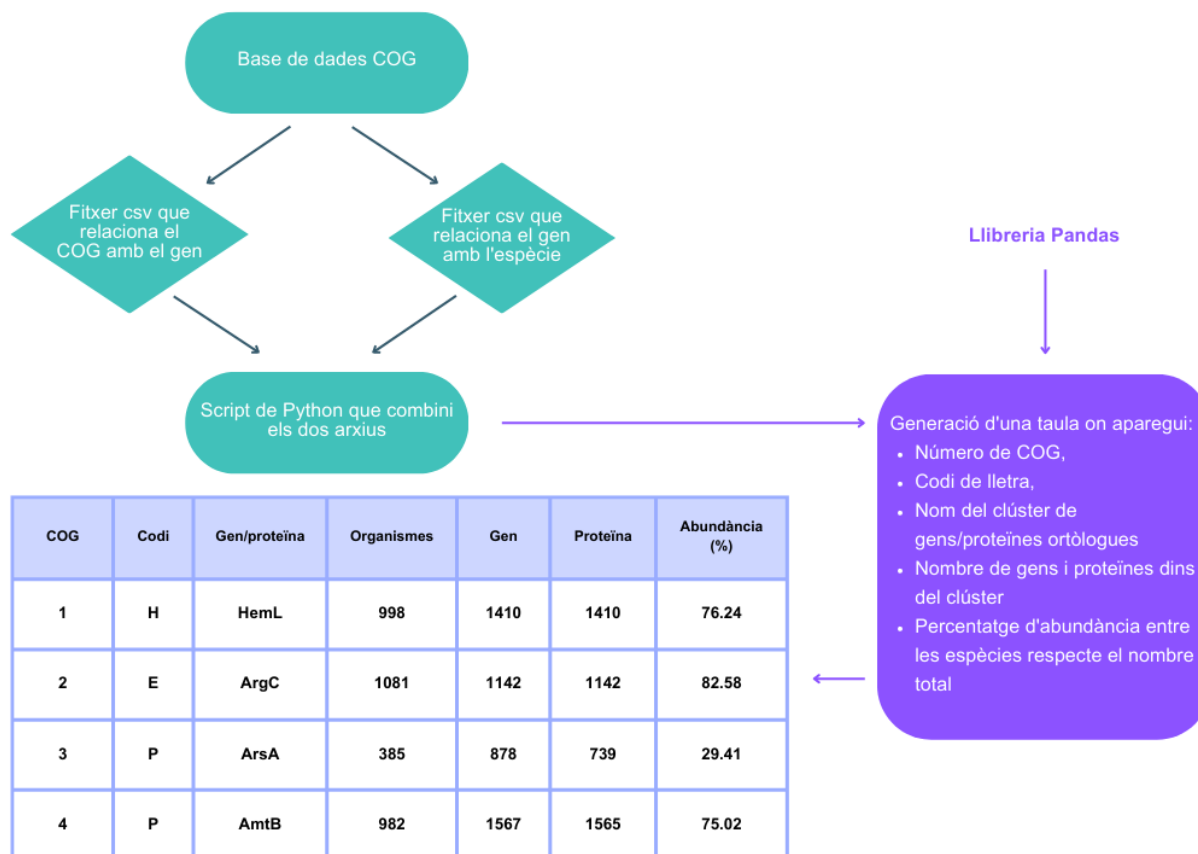


Fig 4: diagrama de flux que descriu el procés de creació de l'script de Python.

\*Consultar codi a Annex II.

## Cerca literària de proteïnes i puntuació segons el seu potencial com a probiòtic

Utilitzant eines com el cercador avançat de PubMed, Frontiers o Google Scholar, es realitza una cerca sistemàtica manual (de tots els articles) de cada COG, en funció de l'activitat probiòtica descrita en la bibliografia. Segons el seu potencial es classifica en una de les categories següents:

- 2: Activitat probiòtica important ja descrita en probiòtics coneguts.
- 1: Es troben en espècies probiòtiques, però també desenvolupen funcions importants en no probiòtiques.
- 0: Neutral o desconeguda.
- -1: Potencialment perillós.
- -2: Tòxic.

L'agrupació de tots els COGs en aquestes 5 categories ve determinada per la seva activitat probiòtica. Per exemple, en els COGs relacionats amb la formació de biofilm, la cerca literària dona com a resultat que en espècies probiòtiques aporten protecció contra la instauració de possibles patògens ([Tan et al. 2020](#)), cosa que en un principi s'hauria de classificar en el grup 2. Tanmateix, la formació de biofilm també es considera un factor de virulència, descrit en alguns patògens com *K. Pneumoniae* ([Wang et al. 2020](#)). Per tant, encara que sigui important en espècies probiòtiques, la seva presència en espècies patògenes fa que es classifiqui dins de la categoria 1.

Cal comentar que la funció de cada COG normalment ja ve determinada per la mateixa base de dades, en els casos en els quals no ho indica s'haurà de buscar pel nom de la proteïna a les bases de dades mencionades a l'inici.

A l'apartat Resultats es mostren els diferents grups sota cada puntuació, i la justificació darrera de la seva classificació.

### **Desenvolupament d'una puntuació de probiòtics a partir del data set**

Fent ús de la funció matriu que permet la base de dades COG, comentada a l'inici de Metodologia, es desenvolupa una puntuació de cada organisme. La matriu es basa en l'ús d'1 i 0: 1 per indicar que l'organisme té el COG en el seu genoma i 0 per indicar que no el té.

A continuació, es combina aquesta matriu amb la puntuació segons el potencial probiòtic desenvolupada anteriorment, realitzant una suma final de totes les proteïnes presents en un organisme amb la seva classificació.

En endreçar les espècies de major a menor puntuació final, el resultat esperat és que aquells organismes que són coneguts probiòtics estiguin situats en els primers llocs de la llista, i les espècies patogèniques ocupin les posicions finals.

## RESULTATS, DISCUSSIÓ I RELACIÓ AMB ELS OBJECTIUS PLANTEJATS

---

### Resultats de la cerca bibliogràfica segons el potencial probiòtic



Les dades d'aquest sector corresponen als resultats de la cerca literària manual individual de cada COG. Cada puntuació es divideix en subtipus depenent de la funció amb relació al potencial probiòtic. En addició, es comenten diversos exemples i es justifica cada puntuació atorgada.

### Freqüència de cada categoria COG en funció de la seva classificació



En aquest apartat de la memòria es mostra un Heatmap generat a partir de cada categoria del COG en funció del potencial probiòtic. Mostra les tres categories del COG amb major percentatge de proteïnes amb puntuació 2.

Seguidament, s'esmenten quines són aquestes categories, en quins processos estan implicades, i quines subcategories de l'apartat anterior en formen part.

Es consideren aquestes categories com les més importants a l'hora de classificar un bacteri com a probiòtic.

També es fa referència a una taula on apareixen els biomarcadors proteics trobats dins de cadascuna de les 3 categories, i que, per tant, serien les proteïnes amb major potencial probiòtic.

### Exemple de distribució dels COGs en una soca probiòtica coneguda

Per tal de posar en context alguns dels COGs obtinguts en la categoria 2, es posarà com a exemple una representació del genoma de *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

Aquesta soca forma part dels coneguts bacteris ácido làctics LAB, i resideix al tracte gastrointestinal humà. És un conegut probiòtic utilitzat sobretot com a suplement alimentari ([Bungau et al. 2021](#)). Entre els seus efectes sobre la salut humana destaquen: regulació de la flora intestinal ([Gao et al. 2022](#)), increment del sistema immunitari ([Kang et al. 2022](#)), efecte anticancerígen ([Bungau et al. 2021](#)), i reducció del colesterol ([Çiftci i Tuna 2021](#)).



## Discussió

Existeixen estudis que es basen en l'anàlisi del genoma complet d'alguns bacteris, ressaltant els COGs que podrien estar involucrats en la seva activitat com a probiòtic ([Zhao et al. 2023](#)), ([Jiang et al. 2023](#)). Tanmateix, avui dia, aquest treball és el primer a desenvolupar mètode d'identificació de bacteris probiòtics a partir de biomarcadors proteics.

Al ser pioner en aquest camp presenta alguns detalls a polir. Per exemple, durant la realització del treball, s'ha descobert que molts patògens tenen característiques semblants a bacteris probiòtics. En aquests casos, aquestes espècies haurien de ser excloses directament, encara que puguin tindre algunes proteïnes amb potencial probiòtic. També existiria la possibilitat de modificar-les per enginyeria genètica, podent eliminar aquells gens que facin d'un bacteri un patògen.

En comparació amb algunes plataformes de visualització de genomes bacterians que també utilitzen COG, aquesta proposta mostra certes limitacions. Un exemple es dona en el cas de l'eina desenvolupada per científics de la Universitat Tècnica Federico Santa María de Xile, anomenada *GenoVi* ([Cumsille et al. 2023](#)). Aquest programa basat en *Python*, combina el genoma extret de *GenBank* ([Benson et al. 2018](#)) amb les categories el COG, i a partir de l'eina *Circos* ([Jhuraney et al. 2015](#)) genera una representació del genoma en forma circular. En aquesta representació ve inclosa un heatmap de la freqüència de cada categoria del COG en la mostra, un histograma de l'abundància dels COGs, i una taula resum de totes les característiques gèniques. A més a més, el programa permet personalitzar els resultats, oferint diverses paletes de colors i podent ressaltar proteïnes d'interès.

## CONCLUSIONS

---

Durant el transcurs de les pàgines de la memòria s'ha introduït el concepte de bacteris probiòtics, així com la seva relació amb la microbiota intestinal. D'altra banda, també s'ha descrit el funcionament de la base de dades COG, i la seva divisió en categories segons la funció.

A través de la cerca manual literària, s'ha aconseguit determinar de manera individual el potencial probiòtic de proteïnes, segons la seva funció i interacció amb la microbiota. La puntuació d'aquestes dades ha permès classificar-les en diverses categories, obtenint aquelles que estan estretament relacionades amb els mecanismes d'acció dels probiòtics. La taula obtinguda de biomarcadors proteics obre el camp del disseny gènic de probiòtics, podent arribar a expressar proteïnes importants per les seves funcions, i eliminar aquelles que els perjudiquen.

Els resultats finals de la memòria estableixen uns criteris proteics per a la definició exacta del terme probiòtic. Aquests criteris podrien ajudar a les agències reguladores (com la FDA als Estats Units o la EMA a Europa), a establir millors pautes per a l'aprovació i regulació dels probiòtics.

### Perspectives de futur

Les futures investigacions s'haurien de centrar en mapejar els COGs en bacteris per observar quins tenen millor puntuació com a probiòtic. Una aproximació similar a l'explicada a la Figura 6, però més completa i amb una metodologia quantitativa. L'objectiu principal d'aquests estudis seria l'elaboració d'un índex, per saber amb exactitud quines són les proteïnes necessàries perquè una soca bacteriana mostri un potencial més alt.

Aquesta memòria té el principal objectiu de contribuir a futurs estudis multidisciplinaris, sobre els efectes de determinades proteïnes en relació amb el seu potencial com a probiòtic.



En el següent paràgraf s'esmenta la futura primera aplicació de la memòria, a càrrec del centre propietari de les dades. Sense entrar en detalls, consisteix en la creació d'una base de dades per avaluar el potencial probiòtic de diverses espècies a partir dels COGs.

També s'inclou una captura de pantalla de la interfície de la base de dades en desenvolupament.

La base de dades tindria l'objectiu principal de facilitar la tasca d'identificació de bacteris probiòtics a partir de biomarcadors proteics, proporcionant una base sòlida per a futures investigacions i per l'avanç en el coneixement dels probiòtics i la microbiota.

## BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

---

1. Abhyankar WR, Zheng L, Brul S, de Koster CG, de Koning LJ. Vegetative Cell and Spore Proteomes of *Clostridioides difficile* Show Finite Differences and Reveal Potential Protein Markers. *J Proteome Res.* 2019;18(11):3967-3976. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00413
2. Adam PS, Borrel G, Gribaldo S. Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(6):E1166-E1173. doi:10.1073/pnas.1716667115
3. Afanador GA, Guerra AJ, Swift RP, et al. A novel lipote attachment enzyme is shared by *Plasmodium* and *Chlamydia* species. *Mol Microbiol.* 2017;106(3):439-451. doi:10.1111/mmi.13776
4. Agnello M, Cen L, Tran NC, Shi W, McLean JS, He X. Arginine improves pH homeostasis via metabolism and microbiome modulation. *J Dent Res.* 2017;96(8):924-930. doi:10.1177/0022034517707512

5. Ahmadi S, Wang S, Nagpal R, et al. A human-origin probiotic cocktail ameliorates aging-related leaky gut and inflammation via modulating the microbiota/taurine/tight junction axis. *JCI Insight*. 2020;5(9). doi:10.1172/jci.insight.132055
6. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*. 2020;72(3):558-577. doi:10.1016/j.jhep.2019.10.003
7. Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front Neurosci*. 2015;9:23. doi:10.3389/fnins.2015.00023
8. Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(11):3906-3912. doi:10.1073/pnas.0409188102
9. Altomare A, Di Rosa C, Imperia E, Emerenziani S, Cicala M, Guarino MPL. Diarrhea Predominant-Irritable Bowel Syndrome (IBS-D): Effects of Different Nutritional Patterns on Intestinal Dysbiosis and Symptoms. *Nutrients*. 2021;13(5). doi:10.3390/nu13051506
10. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
11. Amato M, Di Spirito F, D'Ambrosio F, Boccia G, Moccia G, De Caro F. Probiotics in Periodontal and Peri-Implant Health Management: Biofilm Control, Dysbiosis Reversal, and Host Modulation. *Microorganisms*. 2022;10(11). doi:10.3390/microorganisms10112289
12. Arnaouteli S, Bamford NC, Stanley-Wall NR, Kovács ÁT. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(9):600-614. doi:10.1038/s41579-021-00540-9
13. Auclair SM, Bhanu MK, Kendall DA. Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci*. 2012;21(1):13-25. doi:10.1002/pro.757

14. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. Gut Microbes. 2014;5(5):579-593. doi:10.4161/19490976.2014.969632
15. Bao H, Wang S, Zhao J-H, Liu S-L. Salmonella secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. Microbiol Res. 2020;241:126591. doi:10.1016/j.micres.2020.126591
16. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. Nucleic Acids Res. 2018;46(D1):D41-D47. doi:10.1093/nar/gkx1094
17. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J Lipid Res. 2013;54(9):2325-2340. doi:10.1194/jlr.R036012
18. Bonetto S, Fagoonee S, Battaglia E, Grassini M, Saracco GM, Pellicano R. Recent advances in the treatment of irritable bowel syndrome. Pol Arch Intern Med. 2021;131(7-8):709-715. doi:10.20452/pamw.16067
19. Bren A, Eisenbach M. How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. J Bacteriol. 2000;182(24):6865-6873. doi:10.1128/JB.182.24.6865-6873.2000
20. Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and transcriptional response of Lactobacillus casei ATCC 334 to acid stress. J Bacteriol. 2010;192(9):2445-2458. doi:10.1128/JB.01618-09
21. Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in Lactobacillus acidophilus NCFM. Appl Environ Microbiol. 2005;71(12):8344-8351. doi:10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005
22. Bungau SG, Behl T, Singh A, et al. Targeting probiotics in rheumatoid arthritis. Nutrients. 2021;13(10). doi:10.3390/nu13103376
23. Cao K-Y, Pan Y, Yan T-M, Tao P, Xiao Y, Jiang Z-H. Antitumor Activities of tRNA-Derived Fragments and tRNA Halves from Non-pathogenic Escherichia coli Strains on Colorectal Cancer and Their Structure-Activity Relationship. mSystems. 2022;7(2):e0016422. doi:10.1128/msystems.00164-22

24. Cardiovascular disease - NHS. Consultat el 25 d'abril, 2023.  
<https://www.nhs.uk/conditions/cardiovascular-disease/>
25. Chen J, Vitetta L. Gut microbiota metabolites in NAFLD pathogenesis and therapeutic implications. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15).  
doi:10.3390/ijms21155214
26. Çiftci G, Tuna E. Effects of cholesterol and *Lactobacillus acidophilus* on testicular function. *Clin Exp Reprod Med.* 2021;48(3):229-235.  
doi:10.5653/cerm.2020.04322
27. COG - NCBI. Consultat el 30 de maig, 2023.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>
28. Cohen SE, Can M, Wittenborn EC, Hendrickson RA, Ragsdale SW, Drennan CL. Crystallographic Characterization of the Carbonylated A-Cluster in Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase. *ACS Catal.* 2020;10(17):9741-9746. doi:10.1021/acscatal.0c03033
29. Collado MC, Gueimonde M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *J Food Prot.* 2006;69(7):1675-1679. doi:10.4315/0362-028x-69.7.1675
30. Couto I, Costa SS, Viveiros M, Martins M, Amaral L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(3):504-513. doi:10.1093/jac/dkn217
31. Cumsille A, Durán RE, Rodríguez-Delherbe A, et al. GenoVi, an open-source automated circular genome visualizer for bacteria and archaea. *PLoS Comput Biol.* 2023;19(4):e1010998.  
doi:10.1371/journal.pcbi.1010998
32. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(8):461-478. doi:10.1038/s41575-019-0157-3
33. Dantzer R, Cohen S, Russo SJ, Dinan TG. Resilience and immunity. *Brain Behav Immun.* 2018;74:28-42. doi:10.1016/j.bbi.2018.08.010
34. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(1):51-65. doi:10.1080/14787210.2018.1417036

35. Díaz-Jiménez J, Sánchez-Sánchez E, Ordoñez FJ, et al. Impact of probiotics on the performance of endurance athletes: A systematic review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(21). doi:10.3390/ijerph182111576
36. Dixon A, Robertson K, Yung A, et al. Efficacy of Probiotics in Patients of Cardiovascular Disease Risk: a Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Hypertens Rep*. 2020;22(9):74. doi:10.1007/s11906-020-01080-y
37. Dridi B, Fardeau M-L, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62(Pt 8):1902-1907. doi:10.1099/ijs.0.033712-0
38. Dumitrescu L, Popescu-Olaru I, Cozma L, et al. Oxidative Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:2406594. doi:10.1155/2018/2406594
39. Engle S, Whalen S, Joshi A, Pollard KS. Unboxing cluster heatmaps. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(Suppl 2):63. doi:10.1186/s12859-016-1442-6
40. Eurecat Centre Tecnològic - Innovant per a les empreses. Consultat el 8 de maig, 2023. <https://eurecat.org/>
41. EURECAT Technology Centre | Advanced Technologies for Industry. Consultat el 8 de maig, 2023. <https://ati.ec.europa.eu/technology-centre/eurecat-technology-centre>
42. Europe PMC. - Abstract - Europe PMC.
43. Fila M, Chojnacki C, Chojnacki J, Blasiak J. Nutrients to improve mitochondrial function to reduce brain energy deficit and oxidative stress in migraine. *Nutrients*. 2021;13(12). doi:10.3390/nu13124433
44. Firman J, Liu L, Mahalak K, et al. An in vitro analysis of how lactose modifies the gut microbiota structure and function of adults in a donor-independent manner. *Front Nutr*. 2022;9:1040744. doi:10.3389/fnut.2022.1040744
45. Ford AC, Harris LA, Lacy BE, Quigley EMM, Moayyedi P. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;48(10):1044-1060. doi:10.1111/apt.15001

46. Galperin MY, Kristensen DM, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Microbial genome analysis: the COG approach. *Brief Bioinformatics*. 2019;20(4):1063-1070. doi:10.1093/bib/bbx117
47. Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., & Koonin, E. V. (2021). COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic acids research*, 49(D1), D274–D281. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1018>
48. Gao H, Li X, Chen X, et al. The Functional Roles of *Lactobacillus acidophilus* in Different Physiological and Pathological Processes. *J Microbiol Biotechnol*. 2022;32(10):1-8.
49. GenBank Overview. Consultat el 27 de maig, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
50. Gordillo TB, Palumbo MC, Allievi MC, Fernández Do Porto DA, Ruzal SM, Palomino MM. Strategies to display heterologous proteins on the cell surface of lactic acid bacteria using as anchor the C-terminal domain of *Lactobacillus acidophilus* SlpA. *World J Microbiol Biotechnol*. 2020;36(11):169. doi:10.1007/s11274-020-02945-9
51. Gottesman S, Trisler P, Torres-Cabassa A. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol*. 1985;162(3):1111-1119. doi:10.1128/jb.162.3.1111-1119.1985
52. Grabacka M, Plonka PM. Mitochondrial sirtuins at the crossroads of energy metabolism and oncogenic transformation. In: *Sirtuin Biology in Cancer and Metabolic Disease*. Elsevier; 2021:103-126. doi:10.1016/B978-0-12-822467-0.00001-2
53. Guo X-P, Sun Y-C. New Insights into the Non-orthodox Two Component Rcs Phosphorelay System. *Front Microbiol*. 2017;8:2014. doi:10.3389/fmicb.2017.02014
54. Hayden JD, Ades SE. The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 2008;3(2):e1573. doi:10.1371/journal.pone.0001573

55. He J, Zhang P, Shen L, et al. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17). doi:10.3390/ijms21176356
56. Heart Disease and Stroke Statistics - 2023 Update - Professional Heart Daily | American Heart Association. Consultat el 25 d'abril, 2023. <://professional.heart.org/en/science-news/heart-disease-and-stroke-statistics-2023-update>
57. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(2):121-135. doi:10.1038/nrm.2017.95
58. Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(8):506-514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66
59. Huang X, Zhang K, Deng M, et al. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2017;82:256-262. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.06.026
60. Hulin J-A, Gubareva EA, Jarzebska N, Rodionov RN, Mangoni AA, Tommasi S. Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) enzymes as an emerging therapeutic strategy to target angiogenesis and vasculogenic mimicry in cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1455. doi:10.3389/fonc.2019.01455
61. Hymes JP, Klaenhammer TR. Stuck in the Middle: Fibronectin-Binding Proteins in Gram-Positive Bacteria. *Front Microbiol.* 2016;7:1504. doi:10.3389/fmicb.2016.01504
62. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol.* 2007;297(5):353-363. doi:10.1016/j.ijmm.2007.04.001
63. Jhuraney A, Velkova A, Johnson RC, et al. BRCA1 Circos: a visualisation resource for functional analysis of missense variants. *J Med Genet.* 2015;52(4):224-230. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102766

64. Jiang Y-H, Yang R-S, Lin Y-C, et al. Assessment of the safety and probiotic characteristics of *Lactobacillus salivarius* CGMCC20700 based on whole-genome sequencing and phenotypic analysis. *Front Microbiol.* 2023;14:1120263. doi:10.3389/fmicb.2023.1120263
65. Jie Z, Xia H, Zhong S-L, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun.* 2017;8(1):845. doi:10.1038/s41467-017-00900-1
66. Jin M, Qian Z, Yin J, Xu W, Zhou X. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease. *J Cell Mol Med.* 2019;23(4):2343-2350. doi:10.1111/jcmm.14195
67. Kang Y, Kang X, Yang H, et al. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability. *Pharmacol Res.* 2022;175:106020. doi:10.1016/j.phrs.2021.106020
68. Khalid M, Petroianu G, Adem A. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives. *Biomolecules.* 2022;12(4). doi:10.3390/biom12040542
69. Khan S, Moore RJ, Stanley D, Chousalkar KK. The Gut Microbiota of Laying Hens and Its Manipulation with Prebiotics and Probiotics To Enhance Gut Health and Food Safety. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(13). doi:10.1128/AEM.00600-20
70. Kiani AK, Anpilogov K, Dautaj A, et al. Bacteriophages in food supplements obtained from natural sources. *Acta Biomed.* 2020;91(13-S):e2020025. doi:10.23750/abm.v91i13-S.10834
71. Kim S-K, Guevarra RB, Kim Y-T, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol.* 2019;29(9):1335-1340. doi:10.4014/jmb.1906.06064
72. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:323-355. doi:10.1146/annurev-biochem-060208-092442

73. Kleniewska P, Pawliczak R. The influence of apocynin, lipoic acid and probiotics on antioxidant enzyme levels in the pulmonary tissues of obese asthmatic mice. *Life Sci.* 2019;234:116780. doi:10.1016/j.lfs.2019.116780
74. Komura T, Takemoto A, Kosaka H, Suzuki T, Nishikawa Y. Prolonged Lifespan, Improved Perception, and Enhanced Host Defense of *Caenorhabditis elegans* by *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*. *Microbiol Spectr.* 2022;10(3):e0045421. doi:10.1128/spectrum.00454-21
75. Korhonen R, Korpela R, Saxelin M, Mäki M, Kankaanranta H, Moilanen E. Induction of nitric oxide synthesis by probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in J774 macrophages and human T84 intestinal epithelial cells. *Inflammation.* 2001;25(4):223-232. doi:10.1023/a:1010971703271
76. Kröninger L, Berger S, Welte C, Deppenmeier U. Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *FEBS J.* 2016;283(3):472-483. doi:10.1111/febs.13594
77. Kröninger L, Steiniger F, Berger S, Kraus S, Welte CU, Deppenmeier U. Energy conservation in the gut microbe *Methanomassiliicoccus luminyensis* is based on membrane-bound ferredoxin oxidation coupled to heterodisulfide reduction. *FEBS J.* 2019;286(19):3831-3843. doi:10.1111/febs.14948
78. Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 2009;19(9):1639-1645. doi:10.1101/gr.092759.109
79. Kurtz CB, Millet YA, Puurunen MK, et al. An engineered *E. coli* Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans. *Sci Transl Med.* 2019;11(475). doi:10.1126/scitranslmed.aau7975
80. Li Q, Tao Q, Teixeira JS, Shu-Wei Su M, Gänzle MG. Contribution of glutaminases to glutamine metabolism and acid resistance in *Lactobacillus reuteri* and other vertebrate host adapted lactobacilli. *Food Microbiol.* 2020;86:103343. doi:10.1016/j.fm.2019.103343

81. Li S-C, Lin H-P, Chang J-S, Shih C-K. Lactobacillus acidophilus-Fermented Germinated Brown Rice Suppresses Preneoplastic Lesions of the Colon in Rats. *Nutrients*. 2019;11(11). doi:10.3390/nu11112718
82. Lim HY, Jeong D, Park SH, et al. Antiwrinkle and Antimelanogenesis Effects of Tyndallized Lactobacillus acidophilus KCCM12625P. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5). doi:10.3390/ijms21051620
83. Liu S, Zhao W, Liu X, Cheng L. Metagenomic analysis of the gut microbiome in atherosclerosis patients identify cross-cohort microbial signatures and potential therapeutic target. *FASEB J*. 2020;34(11):14166-14181. doi:10.1096/fj.202000622R
84. Liu X, Cao S, Zhang X. Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *J Agric Food Chem*. 2015;63(36):7885-7895. doi:10.1021/acs.jafc.5b02404
85. Lo J, Humphreys JR, Jack J, et al. The Metabolism of Clostridium ljungdahlii in Phosphotransacetylase Negative Strains and Development of an Ethanologenic Strain. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:560726. doi:10.3389/fbioe.2020.560726
86. Losada-Medina D, Yitbarek A, Nazeer N, Uribe-Diaz S, Ahmed M, Rodriguez-Lecompte JC. Identification, tissue characterization, and innate immune role of Angiogenin-4 expression in young broiler chickens. *Poult Sci*. 2020;99(6):2992-3000. doi:10.1016/j.psj.2020.03.022
87. Mahiddine FY, You I, Park H, Kim MJ. Management of dog sperm parameters and gut microbiota composition with Lactobacillus rhamnosus supplementation. *Vet Res Commun*. Published online March 28, 2023. doi:10.1007/s11259-023-10116-
88. Marco ML, Heeney D, Binda S, et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;44:94-102. doi:10.1016/j.copbio.2016.11.010
89. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017;9(9). doi:10.3390/nu9091021

90. Marques FZ, Nelson E, Chu P-Y, et al. High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive Mice. *Circulation*. 2017;135(10):964-977. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024545
91. Mathiesen G, Sveen A, Brurberg MB, Fredriksen L, Axelsson L, Eijsink VG. Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics*. 2009;10:425. doi:10.1186/1471-2164-10-425
92. Mazein A, Watterson S, Hsieh W-Y, Griffiths WJ, Ghazal P. A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(1):56-66. doi:10.1016/j.bcp.2013.03.021
93. McCarty MF, DiNicolantonio JJ. Maintaining Effective Beta Cell Function in the Face of Metabolic Syndrome-Associated Glucolipotoxicity-Nutraceutical Options. *Healthcare (Basel)*. 2021;10(1). doi:10.3390/healthcare10010003
94. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 2001;413(6858):852-856. doi:10.1038/35101614
95. Mendonça AA, Pinto-Neto W de P, da Paixão GA, Santos D da S, De Moraes MA, De Souza RB. Journey of the probiotic bacteria: survival of the fittest. *Microorganisms*. 2022;11(1). doi:10.3390/microorganisms11010095
96. Moodley C, Reid SJ, Abratt VR. Molecular characterisation of ABC-type multidrug efflux systems in *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe*. 2015;32:63-69. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.12.00
97. Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Front Microbiol*. 2018;9:757. doi:10.3389/fmicb.2018.00757
98. Muñoz-Provencio D, Pérez-Martínez G, Monedero V. Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *J Appl Microbiol*. 2010;108(3):1050-1059. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04508.x
99. Oberg TS, Steele JL, Ingham SC, et al. Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(12):1947-1953. doi:10.1007/s10295-011-0983-y

100. Oberg TS, Ward RE, Steele JL, Broadbent JR. Transcriptome analysis of *Bifidobacterium longum* strains that show a differential response to hydrogen peroxide stress. *J Biotechnol.* 2015;212:58-64. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.405
101. Oka P, Parr H, Barberio B, Black CJ, Savarino EV, Ford AC. Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(10):908-917. doi:10.1016/S2468-1253(20)30217-X
102. Ozen M, Dinleyici EC. The history of probiotics: the untold story. *Benef Microbes.* 2015;6(2):159-165. doi:10.3920/BM2014.0103
103. Pais P, Almeida V, Yilmaz M, Teixeira MC. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *J Fungi (Basel).* 2020;6(2). doi:10.3390/jof6020078
104. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18). doi:10.3390/ijms22189922
105. Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(6):H3227-45. doi:10.1152/ajpheart.00998.2007
106. Petit RA, Read TD. Bactopia: a flexible pipeline for complete analysis of bacterial genomes. *mSystems.* 2020;5(4). doi:10.1128/mSystems.00190-2
107. Pinheiro PG, Santiago GMP, da Silva FEF, et al. Ferulic acid derivatives inhibiting *Staphylococcus aureus* tetK and MsrA efflux pumps. *Biotechnol Rep (Amst).* 2022;34:e00717. doi:10.1016/j.btre.2022.e00717
108. Pintarič M, Langerholc T. Probiotic mechanisms affecting glucose homeostasis: A scoping review. *Life (Basel).* 2022;12(8). doi:10.3390/life12081187
109. PubChem. Lipoate | C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> - PubChem.
110. Quigley EMM. Prebiotics and probiotics in digestive health. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(2):333-344. doi:10.1016/j.cgh.2018.09.028

111. Ragsdale SW, Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(12):1873-1898. doi:10.1016/j.bbapap.2008.08.012
112. Raval U, Harary JM, Zeng E, Pasinetti GM. The dichotomous role of the gut microbiome in exacerbating and ameliorating neurodegenerative disorders. *Expert Rev Neurother*. 2020;20(7):673-686. doi:10.1080/14737175.2020.1775585
113. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol*. 2016;7:979. doi:10.3389/fmicb.2016.00979
114. Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Miyagusuku-Cruzado G, Giusti MM, Jiménez-Flores R, García-Cano I. Growth of lactic acid bacteria in milk phospholipids enhances their adhesion to Caco-2 cells. *J Dairy Sci*. 2020;103(9):7707-7718. doi:10.3168/jds.2020-18271
115. Saier MH. The Bacterial Phosphotransferase System: New Frontiers 50 Years after Its Discovery. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2015;25(2-3):73-78. doi:10.1159/000381215
116. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(10):605-616. doi:10.1038/s41575-019-0173-
117. Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun*. 2001;69(6):3523-3535. doi:10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001
118. Schauer O, Mostaghaci B, Colin R, et al. Motility and chemotaxis of bacteria-driven microswimmers fabricated using antigen 43-mediated biotin display. *Sci Rep*. 2018;8(1):9801. doi:10.1038/s41598-018-28102-9
119. Schwartz L, Cohen A, Thomas J, Spencer JD. The immunomodulatory and antimicrobial properties of the vertebrate ribonuclease A superfamily. *Vaccines (Basel)*. 2018;6(4). doi:10.3390/vaccines6040076

120. Shandilya S, Kumar S, Kumar Jha N, Kumar Kesari K, Ruokolainen J. Interplay of gut microbiota and oxidative stress: Perspective on neurodegeneration and neuroprotection. *J Advanc Res.* 2022;38:223-244. doi:10.1016/j.jare.2021.09.005
121. Sharer JD. Amino Acid Disorders. In: *Encyclopedia of the Neurological Sciences.* Elsevier; 2014:136-147. doi:10.1016/B978-0-12-385157-4.00075-0
122. Sherwin E, Dinan TG, Cryan JF. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1420(1):5-25. doi:10.1111/nyas.13416
123. Shiadeh SMJ, Azimi L, Azimi T, et al. Upregulation of efrAB efflux pump among *Enterococcus faecalis* ST480, ST847 in Iran. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2020;67(3):187-192. doi:10.1556/030.2020.01173
124. Shida K, Takahashi R, Iwadate E, et al. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy.* 2002;32(4):563-570. doi:10.1046/j.0954-7894.2002.01354.x
125. Simon E, Călinoiu LF, Mitrea L, Vodnar DC. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Implications and Beneficial Effects against Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients.* 2021;13(6). doi:10.3390/nu13062112
126. Smith NW, Shorten PR, Altermann E, Roy NC, McNabb WC. The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding. *Front Ecol Evol.* 2019;7. doi:10.3389/fevo.2019.0015
127. Srikant S. Evolutionary history of ATP-binding cassette proteins. *FEBS Lett.* 2020;594(23):3882-3897. doi:10.1002/1873-3468.13985
128. Stehling O, Paul VD, Bergmann J, Basu S, Lill R. Biochemical Analyses of Human Iron-Sulfur Protein Biogenesis and of Related Diseases. *Meth Enzymol.* 2018;599:227-263. doi:10.1016/bs.mie.2017.11.004
129. Sugimoto S, Abdullah-Al-Mahin, Sonomoto K. Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties. *J Biosci Bioeng.* 2008;106(4):324-336. doi:10.1263/jbb.106.324

130. Sun S, Xu X, Liang L, et al. Lactic Acid-Producing Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* Attenuates Ulcerative Colitis via Suppressing Macrophage Pyroptosis and Modulating Gut Microbiota. *Front Immunol.* 2021;12:777665. doi:10.3389/fimmu.2021.777665
131. Tahoun A, Masutani H, El-Sharkawy H, et al. Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages. *Gut Pathog.* 2017;9:27. doi:10.1186/s13099-017-0177-x
132. Tatusov, R. L., Koonin, E. V., & Lipman, D. J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5338), 631–637. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.631>
133. Tautz L, Critton DA, Grotegut S. Protein tyrosine phosphatases: structure, function, and implication in human disease. *Methods Mol Biol.* 2013;1053:179-221. doi:10.1007/978-1-62703-562-0\_13
134. Tenea GN. Metabiotics Signature through Genome Sequencing and In Vitro Inhibitory Assessment of a Novel *Lactococcus lactis* Strain UTNCys6-1 Isolated from Amazonian Camu-Camu Fruits. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7). doi:10.3390/ijms24076127
135. The UniProt Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue D1, 6 January 2023, Pages D523–D531, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
136. Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, Mushayahama T, Albou L-P, Mi H. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Sci.* 2022;31(1):8-22. doi:10.1002/pro.4218
137. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(11):833-846. doi:10.1038/nrm2039
138. Toropov V, Demyanova E, Shalaeva O, Sitkin S, Vakhitov T. Whole-Genome Sequencing of *Lactobacillus helveticus* D75 and D76 Confirms Safety and Probiotic Potential. *Microorganisms.* 2020;8(3). doi:10.3390/microorganisms8030329

139. Tripathi P, Beaussart A, Andre G, et al. Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*. 2012;43(12):1323-1330.  
doi:10.1016/j.micron.2012.01.001
140. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153-e639. doi:10.1161/CIR.0000000000001052
141. Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziolkiewicz M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*. 2022;11(8).  
doi:10.3390/cells11081312
142. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D480-D489.  
doi:10.1093/nar/gkaa1100
143. Ventura M, Sozzi T, Turrone F, Matteuzzi D, van Sinderen D. The impact of bacteriophages on probiotic bacteria and gut microbiota diversity. *Genes Nutr*. 2011;6(3):205-207. doi:10.1007/s12263-010-0188-4
144. Vertillo Aluisio G, Spitale A, Bonifacio L, et al. Streptococcus salivarius 24SMBc Genome Analysis Reveals New Biosynthetic Gene Clusters Involved in Antimicrobial Effects on Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes. *Microorganisms*. 2022;10(10).  
doi:10.3390/microorganisms10102042
145. Wang C, Cui Y, Qu X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch Microbiol*. 2018;200(2):195-201.
146. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(17). doi:10.3390/ijerph17176278
147. Wang J, Ji H. Influence of probiotics on dietary protein digestion and utilization in the gastrointestinal tract. *Curr Protein Pept Sci*. 2019;20(2):125-131. doi:10.2174/1389203719666180517100339
148. Wang P, Zheng Y, Li Y, Shen J, Dan M, Wang D. Recent advances in biotransformation, extraction and green production of D-mannose. *Curr Res Food Sci*. 2022;5:49-56. doi:10.1016/j.crf.2021.12.002

149. Wang X, Perez E, Liu R, Yan L-J, Mallet RT, Yang S-H. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.* 2007;1132(1):1-9. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.032
150. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63. doi:10.1038/nature09922
151. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17(11):1410-1422. doi:10.1038/nm.2538
152. Weltzer, M. L., & Wall, D. (2023). Social Diversification Driven by Mobile Genetic Elements. *Genes*, 14(3), 648. <https://doi.org/10.3390/genes14030648>
153. WoldemariamYohannes K, Wan Z, Yu Q, et al. Prebiotic, Probiotic, Antimicrobial, and Functional Food Applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Agric Food Chem.* 2020;68(50):14709-14727. doi:10.1021/acs.jafc.0c06396
154. Wu C-C, Hsieh M-Y, Hung S-C, et al. Serum Indoxyl Sulfate Associates with Postangioplasty Thrombosis of Dialysis Grafts. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(4):1254-1264. doi:10.1681/ASN.2015010068
155. Xing S-C, Mi J-D, Chen J-Y, et al. The metabolism and morphology mutation response of probiotic *Bacillus coagulans* for lead stress. *Sci Total Environ.* 2019;693:133490. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.296
156. Zaura E, Twetman S. Critical Appraisal of Oral Pre- and Probiotics for Caries Prevention and Care. *Caries Res.* 2019;53(5):514-526. doi:10.1159/000499037
157. Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9(1):32. doi:10.1186/s40164-020-00191-1
158. Zhang T, Zhang C, Zhang J, Sun F, Duan L. Efficacy of Probiotics for Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:859967. doi:10.3389/fcimb.2022.859967

159. Zhao L, Zhang Y, Liu Y, Zhong J, Zhang D. Assessing the Safety and Probiotic Characteristics of *Lacticaseibacillus rhamnosus* X253 via Complete Genome and Phenotype Analysis. *Microorganisms*. 2023;11(1). doi:10.3390/microorganisms11010140
160. Zuo F, Yu R, Khaskheli GB, et al. Homologous overexpression of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (ahpC) protects *Bifidobacterium longum* strain NCC2705 from oxidative stress. *Res Microbiol*. 2014;165(7):581-589. doi:10.1016/j.resmic.2014.05.040

## AUTOAVALUACIÓ

---

Al llarg d'aquests mesos, he aprofundit el meu coneixement sobre el camp dels probiòtics i la microbiota, sobretot en l'anàlisi del seu genoma. Així mateix, he fet servir eines de treball que em serviran en el meu futur professional, i he pogut treballar amb experts en la matèria que m'han ajudat i guiat quan ho he necessitat. En conclusió, l'experiència de redacció del TFG ha suposat un enriquiment tant professional com personal. Ha sigut la primera experiència en solitari a l'hora de redactar un treball, i estic segura que servirà per al meu creixement com a persona i futura investigadora.

## ANNEXOS

---

### Annex 1: Categories de la base de dades COG

Categoria	Funció
J	Traducció, estructura i biogènesi ribosomal
A	Processament i modificació de l'ARN
K	Transcripció
L	Replicació, recombinació i reparació
B	Estructura i dinàmica de la cromatina
D	Control del cicle cel·lular, divisió cel·lular, partició dels cromosomes
Y	Estructura nuclear

V	Mecanismes de defensa
T	Mecanismes de transducció de senyals
M	Biogènesi de la paret cel·lular/membrana/embolcall
N	Motilitat cel·lular
Z	Citoesquelet
W	Estructures extracel·lulars
U	Transport intracel·lular, secreció i transport vesicular
O	Modificació posttraduccional, recanvi de proteïnes, xaperones
X	Mobiloma: profàgs, transposons
C	Producció i conversió d'energia
G	Transport i metabolisme de carbohidrats
E	Transport i metabolisme d'aminoàcids
F	Transport i metabolisme de nucleòtids
H	Transport i metabolisme de coenzims
I	Transport i metabolisme de lípids
P	Transport i metabolisme d'ions inorgànics
Q	Biosíntesi, transport i catabolisme de metabòlits secundaris
R	Predicció de funció general
S	Funció desconeguda

Informació extreta de la base de dades COG. COG – NCBI. (s. F.).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>

## Annex II: Codi Python

```
import pandas as pd
pd.options.display.max_rows = None

# lectura dels dos arxius csv
data1 =
pd.read_csv('/home/andrea.pignatelli/Documents/sample/cog20cog.csv')
data2 =
pd.read_csv('/home/andrea.pignatelli/Documents/sample/cog20org.csv')

# ús de la funció merge combinant how='inner'
output1 = pd.merge(data1, data2,
                    on='GENE',
                    how='inner')

# mostra el resultat
print(output1)
```

## Annex III: Taules de les tres categories amb COG classificats com a 2



En aquest apartat, es mostra les taules de les 3 categories comentades a Resultats amb tots els COGs que hi pertanyen i les funcions que desenvolupen. Algunes proteïnes estan marcades en vermell, ja que coincideixen amb els de la Figura 6.

*Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia  
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014*

**ANNEX 2**

**FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG**

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: Andrea Pignatelli

Nom i Cognoms del Tutor/a: Dr. Pere Puigbò Avalos

Data de la entrevista amb l'alumne: 28.02.2023

Recomanacions durant el seguiment: Els aspectes tècnics del treball els vam tractar durant les practiques, així que les recomanacions inicials van ser basades en com estructurar la presentació del treball. Hem anat fet reunions periòdiques per anar veient el desenvolupament del treball.

Observacions: L'Andrea no només ha anat treballant de manera autònoma durant el treball, si no que ha incorporat els seus coneixements bioquímics per millorar la innovació de la recerca que ha dut a terme.

Observacions Darrera revisió:

L'Andrea ha fet una bona feina amb la darrera versió del treball i ha tingut en compte els aspectes científics, estructurals i de format.

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 1 de Juny 2023

