

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

Ciencias Biológicas y de la Salud

Especialidad en Biotecnología

**Estudio de agentes selectivos en el
crecimiento de bacterias probióticas**

Tesis que para obtener el Grado de
Especialista en Biotecnología presenta:

I.B.I. Ivonne Figueroa González

Asesoras:

M. en B. Alma E. Cruz Guerrero

Dra. Ma. de Lourdes Escamilla Hurtado

Mayo de 2004.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE AGENTES SELECTIVOS EN EL
CRECIMIENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

I.B.I. IVONNE FIGUEROA GONZÁLEZ

M. en B. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

ASESORA

Dra. MARÍA DE LOURDES ESCAMILLA HURTADO

SINODAL

MÉXICO, D. F.



JULIO 2004.

Estudio de Agentes Selectivos en el Crecimiento de Bacterias Probióticas

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés por mantener una salud apropiada mediante la modificación de la dieta con la finalidad de mejorar la microflora intestinal buscando que ésta a su vez proporcione un efecto benéfico en la salud del huésped. Se han realizado estudios en los cuales se utilizan microorganismos llamados probióticos que son microorganismos capaces de establecerse en el tracto intestinal y formar parte de la flora intestinal propia de cada individuo ayudando a fortalecerla, y sustancias alimenticias denominadas prebióticos que estimulan el crecimiento de los microorganismos ya mencionados; cuando se combinan los probióticos y prebióticos, se espera que el efecto que ejerce cada uno por separado se vea incrementado. Debido a los beneficios que potencialmente se pueden derivar como resultado de la manipulación de la microflora intestinal en términos de prevención y de supresión de bacterias nocivas y promoción del desarrollo de bacterias benéficas, en este estudio nos enfocaremos a evaluar el crecimiento de bacterias probióticas en presencia de coliformes utilizando prebióticos como agentes selectivos, con lo que pretendemos entender la evolución de la microflora intestinal del humano cuando consume probióticos y prebióticos. Para esto se lleva a cabo una simulación *in vitro* de algunas partes del tracto gastrointestinal (Intestino Delgado, Colon Ascendente, Colon Transversal y Colon Descendente), colocando en pequeños reactores que actúan simulando cada una de dichas regiones un medio de cultivo semejante a los fluidos intestinales y con el pH reportado para cada región. En este medio se combinan un probiótico, que en este caso es *Lactobacillus casei* Shirota, con un prebiótico (Oligomato 55[®]) y un microorganismo patógeno (*Escherichia coli*), y se lleva a cabo la simulación de cada una de las regiones. Al finalizar el tiempo de la primera región, se toma una alícuota y se traspa al siguiente reactor (siguiente región) y así sucesivamente hasta terminar la fermentación; de igual forma se realiza una fermentación control para la comparación, la cual no cuenta con el prebiótico y utiliza como fuente de carbono la glucosa.

2. ANTECEDENTES

2.1. Prebióticos

Los prebióticos han sido definidos como “ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un grupo de bacterias en el colon, mejorando así la salud del huésped” (Gibson y Roberfroid, 1995).

Los prebióticos se han convertido en artículos importantes dentro del área de alimentos funcionales. Estos compuestos están diseñados principalmente para ejercer beneficios en los humanos mediante una influencia positiva en la composición de la microflora intestinal. Estos productos se han vuelto una buena alternativa ya que estudios científicos han mostrado evidencia de que algunos compuestos prebióticos son capaces de promover el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el colon, ya que pueden atravesar la parte superior del tracto gastrointestinal sin ser hidrolizados (Kneifel *et al.*, 2000).

Los criterios que permiten la clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico incluyen:

- a) No debe ser hidrolizado, ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal.
- b) Fermentación selectiva por bacterias potencialmente benéficas en el colon.
- c) Alteración en la composición de la microbiota colónica para una composición más saludable.
- d) Preferentemente, inducen efectos que son benéficos para la salud del huésped (Fooks *et al.*, 1999).

2.1.1. Clasificación

Los ingredientes normalmente definidos y estudiados como prebióticos son oligosacáridos, fructooligosacáridos, polisacáridos, etc., y de entre éstos, los que han enfocado mayor interés son galactooligosacáridos y fructooligosacáridos (Crittenden y Playne, 1996; Voragen, 1998). Sin embargo existen otros componentes, como la proteína de la leche lactoferrina o lactotransferrina, que estimulan el desarrollo selectivo de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal, lo cual ha llevado recientemente a definir esta proteína también como un prebiótico (Fox y Flynn, 1992).

Los prebióticos son oligosacáridos no digeribles por el humano por la presencia de ciertos enlaces usualmente definidos como glicósidos que contienen entre 2 y 10 unidades de monosacáridos, en general los oligosacáridos en alimentos no son productos puros, son mezclas que contienen oligosacáridos de diferentes grados de polimerización, son solubles en agua y ligeramente dulces, típicamente 0.3-0.6 del poder edulcorante de la sacarosa (Crittenden y Playne, 1996). Se han reportado muchos oligosacáridos que poseen actividad prebiótica aunque los datos son obtenidos de estudios sencillos en los que los resultados son comparados con un placebo siempre en ensayos *in vitro* o en ensayos con humanos (Rycroft *et al*, 2001).

Los beneficios de los oligosacáridos surgen del incremento de la población de bifidobacterias en el colon las cuales, con su efecto antagonista suprimen la actividad de bacterias putrefactivas reducen la formación de productos tóxicos, la reducción de metabolitos tóxicos, la prevención de diarrea patogénica, entre otras (Tomomatsu, 1994).

2.1.1.1 Disacáridos

La lactulosa (4-0- β -galactopiranosil-D-fructosa) y el lactinol (4-0- β -galactopiranosil-D-glucitol) son derivados sintéticos de la lactosa y han sido empleados en el tratamiento de constipación crónica y encefalopatía hepática. Ambos disacáridos no son absorbidos en el intestino delgado y son fermentados rápidamente por la microflora del colon, mostrando tener un efecto sobre la microflora humana al disminuir las poblaciones de *Clostridium*, coliformes y *Eubacterium*, e incrementando el número de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. (Escalante, 2001)

2.1.1.2. Galactooligosacáridos

Los galactooligosacáridos son azúcares que se encuentran de forma natural en la leche de mamíferos y en algunos productos procesados en los que se pueden obtener mediante reacciones de transgalactosilación o por calentamiento excesivo de la leche. Una de las fuentes más ricas de oligosacáridos bioactivos es la leche humana, la cual juega un papel importante en la salud de los bebés que es atribuible en gran medida a la presencia de dichos azúcares. Por esta razón, desde hace muchos años se han realizado estudios para identificar y estudiar el efecto de los diferentes oligosacáridos. En las últimas cinco décadas se han realizado diversos estudios de los oligosacáridos presentes en la leche humana para establecer su composición estructural y se ha

llegado a la conclusión de que están formados por seis residuos de monosacáridos: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, mucosa y ácido siálico (Miller *et al.*, 1994).

La función biológica de los oligosacáridos presentes en la leche humana aún no se ha dilucidado del todo, sin embargo, se proponen dos posibles mecanismos: el primero, que previenen la adhesión de virus y bacterias en las células epiteliales; por ejemplo, los fucosil-oligogalactósidos son receptores de *Escherichia coli*, la lacto-N-tetraosa o lacto-N-neotrosa son receptores para *Streptococcus pneumoniae* y varios sialil-oligogalactósidos son receptores de *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae* y el virus de influenz A, B y C. El segundo, promueven el crecimiento de *Bifidobacterium bifidus*, el cual es considerado como un microorganismo benéfico para la salud del humano (Nakhla *et al.*, 1999).

Los oligosacáridos transgalactosilados no son hidrolizados o absorbidos en el intestino delgado y parece ser que son rápidamente fermentados en el colon proximal en donde se ha observado que su fermentación por bifidobacterias favorece la proliferación de estas bacterias en estudios *in vivo* (Escalante, 2001). Se ha reportado que el consumo diario de 2.5 g de galactooligosacáridos incrementan significativamente el número de bifidobacterias en el intestino. La ingesta de 5 g/día de galactooligosacáridos incrementa la frecuencia de la función del intestino, y facilita los movimientos del mismo. La ingestión de galactooligosacáridos reduce la producción de ácidos biliares secundarios. Muchos estudios *in vitro* han mostrado que los galactooligosacáridos son utilizados por cepas de bifidobacterias y lactobacilos. Además se ha sugerido que los galactooligosacáridos son utilizados de manera más rápida por las bifidobacterias que otros oligosacáridos como lactulosa y rafinosa (Gopal *et al.*, 2000).

Los oligosacáridos transgalactosilados han sido producidos comercialmente para ser incorporados en productos como el Oligomato 55[®] que es el nombre comercial de una azúcar formada por la acción de la β -galactosidasa en la lactosa. El oligomato consiste principalmente en galactooligosacáridos, en los cuales el principal componente es el 4'-galactosil-lactosa (figura 1). Otros componentes son lactosa y monosacáridos (Boletín de Yakult).

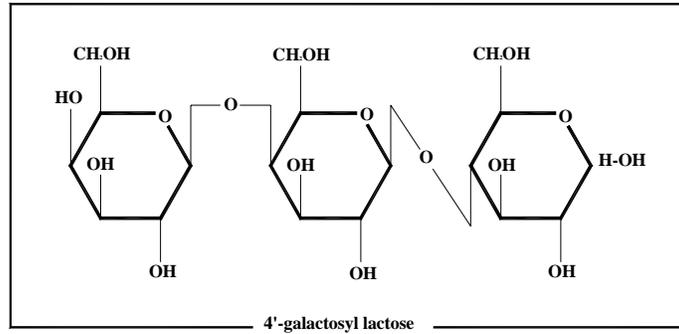


Figura 1. Estructura de la 4'-galactosil-lactosa; componente principal de los galactooligosacáridos
(Boletín de Yakult).

2.1.1.3. Fructooligosacáridos

Los fructooligosacáridos son producidos a partir de la hidrólisis parcial de la inulina extraída a partir de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) por acción de enzimas fúngicas. Otro método de obtención es la síntesis a partir de sacarosa usando la enzima transfructosilasa. Los fructooligosacáridos no son digeridos en el intestino delgado y son rápida y completamente fermentados por la microflora colónica a ácidos grasos de cadena corta (Escalante, 2001).

La inulina es un oligómero de la fructosa presente en muchas plantas, como la cebolla, la achicoria y el ajo. Este azúcar consiste en un polímero de D-fructosa unido por enlaces $\beta(2-1)$ con una D-glucosa unida al extremo terminal de la molécula por enlaces $\alpha(1-2)$. El grado de polimerización de la inulina puede variar de 2 a 60. Esta sustancia tiene probada resistencia a las propiedades degradativas del tracto gastrointestinal y alcanza el colon en forma intacta. Es ahí, en donde sirve como sustrato para el crecimiento de la microflora colónica (Wang y Gibson, 1993).

Los fructooligosacáridos poseen muchas propiedades muy interesantes. Primero, su intensidad en dulzura es muy baja: cerca de una tercera parte de la intensidad de la sacarosa. Esta propiedad es altamente utilizada en alimentos en los cuales está restringido el uso de sacarosa. Segundo, los fructooligosacáridos no tienen un gran aporte calórico, ya que son escasamente hidrolizados por las enzimas lo que los hace poco disponibles como fuente de energía. Tercero, no pueden ser utilizados por *Streptococcus mutans* para formar caries dental. Finalmente, los fructooligosacáridos fomentan el crecimiento de bifidobacterias y no fomentan el crecimiento de microorganismos putrefactores, que tienen tendencia a causar diarrea (Yun, 1996).

2.1.1.4. Oligosacáridos derivados de la soya

Los oligosacáridos derivados de la soya, la rafinosa, la estaquiosa y la verbascosa (pentasacárido), son extraídos directamente de la soya. La capacidad de promover el crecimiento de bifidobacterias ha sido demostrado en humanos sanos, en donde se ha observado que la ingesta de 10 g/día de estos oligosacáridos incrementa significativamente los niveles de bifidobacterias durante el periodo de la ingesta (Escalante, 2001).

2.1.1.5. Proteínas

La lactoferrina es una proteína con las siguientes características fisicoquímicas: peso molecular de 80,000 Da; contenido de carbohidratos de 11.2%; contenido máximo de hierro de 1.4 mg/g; punto isoeléctrico 8.0; y absorbancia a 465 nm de una solución saturada de hierro (Walzem *et al.*, 2002).

La lactoferrina posee propiedades antibacterianas y antioxidantes, es el mayor factor de resistencia contra enfermedades en la glándula mamaria y probablemente regula la acción contra infecciones microbianas de la glándula mamaria. La lactoferrina secuestra y solubiliza el hierro, esto controla la cantidad disponible para el metabolismo en el intestino (Walzem *et al.*, 2002).

En general, las propiedades de la lactoferrina incluyen propiedades antibacterianas y antivirales, prevención del crecimiento de organismos patógenos en el intestino, estimulación de la respuesta inmune, regulación del metabolismo que involucra hierro. La lactoferrina está considerada como un componente importante en la defensa contra organismos que causan infecciones. Aunque la actividad antimicrobiana de la lactoferrina es ampliamente reconocida, su mecanismo de acción aún no está caracterizado completamente. El efecto antimicrobiano está ligado a la actividad formadora de enlaces con el hierro porque la lactoferrina se une a el y deja este nutriente esencial poco disponible para el crecimiento de las bacterias. Además, la lactoferrina humana daña la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. El fragmento peptídico de la lactoferrina tiene una actividad bactericida directa (Walzem *et al.*, 2002).

2.1.2. Usos y Aplicaciones

El mayor uso de los oligosacáridos es en alimentos funcionales tales como bebidas en las cuales se utilizan oligosacáridos de soya o xilooligosacáridos; estos compuestos empiezan a incluirse en yoghures y yoghures para beber para producir simbióticos. Otras aplicaciones son los postres como jaleas y helados, productos de panadería y mermeladas, además de formulas lácteas para infantes (Crittenden y Playne, 1996). Los fructooligosacáridos pueden utilizarse como sustituto de la sacarosa en productos bajos en calorías. Los oligosacáridos pueden utilizarse en la elaboración de productos cárnicos, sodas, cafés, bebidas alcohólicas, leches fermentadas, conservas de frutas, dulces, etc (Voragen, 1998).

2.2. Probióticos

Los probióticos son organismos vivos que, al ingerirse en ciertas cantidades, son capaces de mantener un balance en la flora intestinal. La importancia de los probióticos es significativa ya que tienen una aplicación tanto a nivel industrial en la elaboración de productos (como leches fermentadas) y desde el punto de vista digestivo en el ser humano. Al modificar la microflora intestinal, los probióticos influyen directa e indirectamente en el estado de la salud a través de producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos enteropatógenos (Lee y Salminen, 1995).

Los criterios usados comúnmente para aislar y definir bacterias viables como bacterias probióticas incluyen los siguientes: (Kailasaphaty y Chin, 2000)

1. Géneros de origen humano.
2. Estabilidad al contacto con bilis, ácido, enzimas y oxígeno.
3. Habilidad para adherirse a la mucosa intestinal.
4. Potencial de colonización en el tracto gastrointestinal humano.
5. Producción de sustancias antimicrobianas.
6. Eficacia y seguridad demostrables.

2.2.1. Microorganismos Probióticos

Los microorganismos probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y algunas levaduras con características probióticas semejantes (tabla 1). Las bifidobacterias son habitantes normales en el tracto intestinal, generalmente se encuentran en cantidades superiores a 10^{10} por cada gramo de contenido intestinal; comprenden cerca del 25% de la microflora, sin embargo, la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad (Hopkins *et al.*, 1998). Caracterizadas generalmente como gram-positivas, existen alrededor de 30 especies incluidas en el género *Bifidobacterium*, 10 de las cuales se aislaron de fuentes humanas (caries dental, heces fecales y vagina), 17 del tracto intestinal de rumiantes, 2 de agua de desecho y una de leche fermentada. Los lactobacilos son bacterias gram-positivas, son microorganismos anaerobios y estrictamente fermentativos. En la actualidad se conocen 56 especies del género *Lactobacillus* distribuidas en varios nichos ecológicos como son el tracto gastrointestinal y el tracto genital y constituyen parte importante de la microflora endógena del humano. Su distribución se ve afectada por varios factores ambientales, los cuales incluyen pH, disponibilidad de oxígeno, nivel de sustratos específicos presencia de secreciones e interacción bacteriana (Gomes y Malcata, 1999).

| Cepa | Efecto Clínico en Humanos |
|------------------------------------|---|
| <i>Lactobacillus</i> GG | Adherencia a las células intestinales, estimulación de la respuesta inmune, prevención de la diarrea patogénica. |
| <i>Lactobacillus johnsonii</i> | Prevención de la diarrea del viajero, modulación de la flora intestinal, alivio de la intolerancia a la lactosa. |
| <i>Bifidobacterium lactis</i> | Prevención de la diarrea del viajero, tratamiento contra la diarrea viral incluyendo rotavirus, modulación de la respuesta inmune. |
| <i>Lactobacillus casei</i> Shirota | Modulación de la flora intestinal, efectos positivos en tratamientos contra el cáncer, disminución de la actividad enzimática en las heces fecales. |
| <i>Saccharomyces boulardii</i> | Prevención de la diarrea causada por antibióticos, tratamiento contra la colitis causada por <i>Clostridium difficile</i> . |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | Adherencia a las células intestinales humanas, modulación de la flora intestinal. |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Inhibición de bacterias patógenas, adhesión a las células intestinales humanas. |

Tabla 1. Microorganismos probióticos comúnmente utilizados en forma comercial (Ouwehand *et al.*, 1999)

| Cepa | Efecto Clínico en Humanos |
|---------------------------------|--|
| <i>Bifidobacterium longum</i> | Exclusión competitiva de <i>Escherichia coli</i> , inhibición de <i>E. coli</i> de la superficie de la mucosa intestinal humana. |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | Colonización del tracto gastrointestinal. |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | Reduce o elimina los síntomas de intolerancia a la lactosa. |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | Reduce la duración de la diarrea y aumenta la respuesta inmunológica. |

Tabla 1 (continuación). Microorganismos probióticos comúnmente utilizados en forma comercial (Ouwehand et al., 1999)

Lactobacillus casei Shirota (figura 2) es una bacteria ácido láctica que se encuentra en muchos productos: verduras fermentadas, carne y productos de leche fermentada. Además se encuentra en el tracto intestinal y genital de animales y humanos. *L. casei* Shirota es una bacteria anaerobia ácido tolerante con un metabolismo fermentativo estricto con el ácido láctico en mayores cantidades como producto final, puede ser utilizada ampliamente en la industria por sus propiedades probióticas como cultivos promotores de la salud (www.yakult.com). Metchnikof, sugirió que algunos de los síntomas del metabolismo gastrointestinal enfermo podrían neutralizarse a través de *L. casei* utilizando como medio el yoghurt (Saloff-Coste, 1997).

Algunos de los beneficios de el *Lactobacillus casei* Shirota son fortalecer la flora intestinal; logrando mantenerla en equilibrio y con ello promover la regulación de los movimientos peristálticos (movimiento natural de los intestinos), ayudar a reducir las sustancias tóxicas producidas por las bacterias putrefactivas, incrementar el número de bacterias benéficas en los intestinos, disminuir los niveles altos de colesterol en sangre y estimular el sistema inmunológico (www.yakult.com).

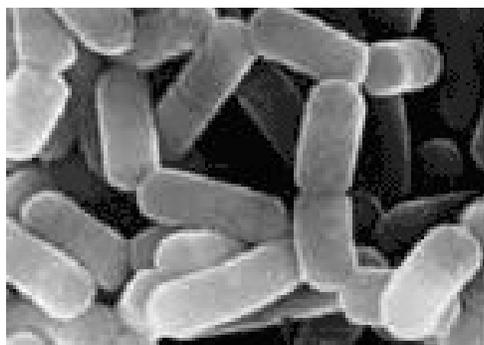


Figura 2. *Lactobacillus casei* Shirota (www.yakult.com)

2.2.2. Mecanismos de Acción

Una parte fundamental de la funcionalidad de las bacterias probióticas es estimular su supervivencia y permanencia prolongada en el tracto gastrointestinal. En la actualidad se proponen varios mecanismos de acción de los probióticos que pueden manifestarse de la siguiente manera:

- Disminución en los síntomas de intolerancia a la lactosa, disminuyendo la concentración de la misma en leche fermentada por actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación y en el tracto intestinal.
- Disminución en la duración de diarrea en niños y adultos y disminución de infecciones gastrointestinales mediante un efecto de barrera al evitar la colonización de la mucosa intestinal por bacterias potencialmente patógenas, además de la producción de compuestos antimicrobianos.
- Disminución en los síntomas de dermatitis atópica y alergia a alimentos.
- Efecto inmunopromotor y propiedades antitumorales (Escalante, 2001).

Las bacterias probióticas pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos, como los ácidos láctico y acético, bacteriocinas y otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono. La producción de ácidos orgánicos por las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasa-tiocianato, en el cual el peróxido de hidrógeno oxida el tiocianato para convertirlo en ácido hidrocianico que es perjudicial para los patógenos. El dióxido de carbono y el diacetil sintetizado por las bacterias ácido lácticas inhiben el crecimiento de patógenos. Numerosas bacteriocinas, como acidofilina, lactobacilina, acidolina, lactocidina y lactolina muestran acción antagónica contra los patógenos (Kailasapathy y Chin, 2000).

Las investigaciones en animales, humanos e *in vitro* se han enfocado principalmente en sus posibles efectos hipocolesterolémicos (disminuir concentraciones de colesterol en sangre), antimicrobianos e inmunomodulantes, así como en su papel en la prevención del cáncer de colon a

través de un consumo regular dando un acercamiento alternativo para asegurar el mantenimiento bacteriano adecuado necesario para obtener el efecto probiótico que se desea. Estudios *in vivo*, con animales y humanos voluntarios, han demostrado que el consumo de bifidobacterias tiene un efecto en la microflora del intestino. Cepas seleccionadas sobreviven al estómago y al tránsito intestinal y llegan al colon en un número abundante. La microflora intestinal es modificada subsecuentemente, como se ha medido en forma directa por ensayos de numeración fecal y enzimática, o indirectamente por la evaluación del tránsito intestinal (Saloff-Coste 1997).

2.2.3. Metabolismo de las Bacterias Lácticas

Los lactobacilos tienen requerimientos para su crecimiento muy complejos. Requieren bajos niveles de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas, un gran número de vitaminas del complejo B, ácidos grasos insaturados y minerales. Las bifidobacterias pueden crecer en medios semisintéticos que contengan sólo lactosa, tres aminoácidos libres (cisteína glicina y triptofano), muchas vitaminas y nucleótidos, lo que contrasta con los grandes requerimientos nutricionales de los lactobacilos. Los lactobacilos fermentan glucosa a ácido láctico en el caso de una homofermentación, o producen cantidades equimolares de ácido láctico y CO₂ en el caso de la heterofermentación (Gomes y Malcata, 1999). Las bacterias ácido lácticas producen ácidos grasos de cadena corta en diversas cantidades como productos metabólicos, los cuales ejercen acción antagónica contra otros organismos (Fooks *et al*, 1999). Se ha sugerido que las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de eliminar bacterias patógenas al convivir estrechamente con ellas ya que producen sustancias antimicrobianas. La mayor parte de estas sustancias son ácidos orgánicos, especialmente láctico y acético. Pueden producir también peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono. Si las bacterias ácido lácticas están metabólicamente activas durante su paso a través de los intestinos, es muy probable que algunas de las sustancias mencionadas se produzcan. Algunos indicadores de esto provienen de la observación de que ciertas cepas probióticas reducen el pH de las heces fecales, lo que indica la producción de ácidos orgánicos. La producción de otros componentes antimicrobianos como diacetil, ácido piroglutámico y bacteriocinas, no es muy común bajo condiciones *in vivo* (Ouwehand *et al.*, 1999).

2.3. Simbióticos

La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, la cual podría aumentar la supervivencia de las bacterias en su fase de tránsito intestinal y por tanto, aumentaría

su potencialidad para desarrollar su función en el colon ya que se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas y por tanto contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos benéficos para la salud. Es responsabilidad de la microflora intestinal, fundamentalmente las bifidobacterias y los lactobacilos, la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles. Estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse. Los prebióticos constituyen el sustrato fundamental (el “alimento”) de las bacterias probióticas (Cagigas, 2002). Está claro que los probióticos y prebióticos son capaces de modificar la composición microbiana interna para volverla una comunidad más sana. Esto ofrece un gran potencial en el manejo de las enfermedades gastrointestinales (como la inhibición de patógenos y la prevención del cáncer de colon) y más efectos sistémicos, por ejemplo, reducción de colesterol en sangre, regulación hormonal, entre otras (Kailasapathy y Chin, 2000).

2. 4. Aparato Digestivo

El aparato digestivo (figura 3) suministra al humano un aporte continuo de agua, electrolitos y nutrientes. Para ellos, son necesarios: 1) movimiento del alimento a través del tubo digestivo; 2) secreción de jugos digestivos y digestión de los alimentos; 3) absorción de los productos digestivos, del agua y de los diversos electrolitos; 4) circulación de la sangre por los órganos gastrointestinales para retirar las sustancias absorbidas, y 5) control de todas esas funciones por los sistemas nervioso y hormonal. Cada parte se adapta a sus funciones especiales, algunas de simple paso de alimento, tales como el esófago, otras de almacenamiento, como el estómago, y otras para su digestión y absorción, como los intestinos (Guyton, 1992).

2.4.1. Funcionamiento

La absorción y metabolización de las sustancias de la dieta y su transformación posterior en energía por la célula requiere la actuación conjunta y coordinada de diferentes órganos, principalmente:

2.4.1.1. Boca

Está constituida por los dientes, la lengua y las glándulas salivales. En ella se introduce el alimento, debiéndose masticar, ablandar, prensar y finalmente deglutir. De esta manera el bolo de alimento pasa al esófago (www.saludalia.com).

2.4.1.2. Esófago

Es una estructura con forma de tubo de unos 20 cm de longitud, cuya función es básicamente propulsar el bolo alimentario hasta la cavidad gástrica (estómago) (www.saludalia.com).

2.4.1.3. Estómago

Estructura en forma de bota que se encuentra a continuación del esófago. Esta "bota" está cerrada por arriba (cardias) y por abajo (píloro) por un esfínter. La función principal del estómago es almacenar el bolo alimentario. Cuando éste llega al estómago, se mezcla con las secreciones gástricas (ácido, enzimas, moco) durante varias horas, dando lugar a un líquido denominado quimo, que se eliminará al intestino de forma paulatina (www.saludalia.com).

2.4.1.4. Intestino delgado

Es el tramo más largo del tubo digestivo, midiendo aproximadamente unos 6 metros de largo. Se divide en tres partes: duodeno (la más proximal), yeyuno (la porción intermedia) e ileon (es la parte más distal y desemboca en el intestino grueso). Su misión es digerir aún más los alimentos que le llegan (quimo gástrico) a través de otras enzimas (páncreas, bilis), para finalmente absorber todos los nutrientes y metabolitos de los alimentos ingeridos a lo largo de sus 6 metros de intestino recubierto de vellosidades. Estos alimentos absorbidos en la pared del intestino delgado pasarán directamente a la sangre, que mediante los vasos sanguíneos alcanzará el hígado (www.saludalia.com).

2.4.1.5. Intestino grueso

Es la parte final del tubo digestivo, midiendo aproximadamente 1.5 metros de longitud. Se divide en varias partes: ciego (donde desemboca el intestino delgado), colon (ascendente, transversal y descendente) y recto/ano (parte final del tubo digestivo por la que se eliminan los residuos alimentarios en forma de heces). La función fundamental del intestino grueso es absorber el abundante líquido que llega hasta aquí, con lo que ayuda a dar consistencia a las heces (desechos

de la alimentación no absorbidos). En segundo lugar el recto cumple la función de almacenar las heces hasta el momento en que se realice la defecación (www.saludalia.com).

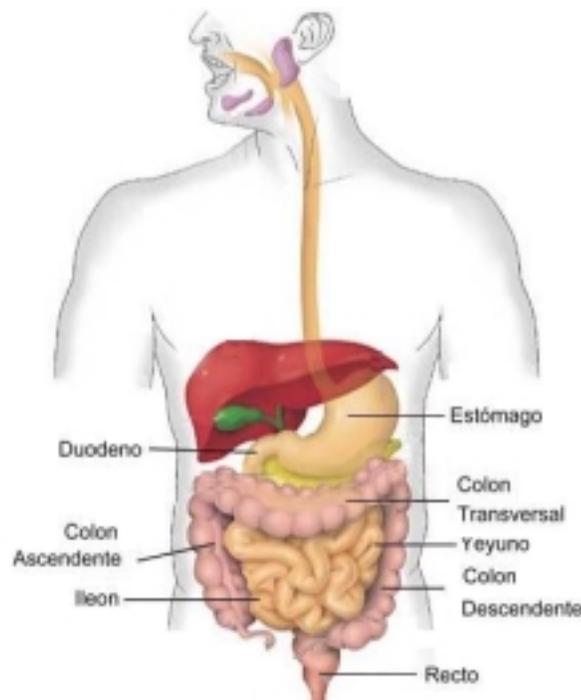


Figura 3. Aparato Digestivo Humano (www.saludalia.com)

2.4.2. Microflora Intestinal

El intestino de los seres humanos es un ecosistema microbiano de una gran diversidad (figura 4). Existen al menos 400-500 especies de bacterias presentes en la flora fecal humana, con concentraciones de hasta 10^{11} microorganismos por gramo de heces. La flora intestinal endógena contiene unas 10^{14} bacterias, es decir 10 veces más que la suma de todas las células del cuerpo humano. Las bacterias exógenas, una vez que han sido ingeridas, circulan por el intestino y constituyen la flora transitoria (Danone Vitapole, 2002).

Estos son los 4 principales grupos de bacterias que representan la microflora colónica y que se encuentran presentes en las muestras de heces humanas: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus* en concentraciones de 10^{10} a 10^{11} aproximadamente ufc/g. Estos organismos se conocen como flora dominante. La flora subdominante o secundaria está compuesta por *Streptococcus*, *Lactobacillus* y en menor cantidad *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* y levaduras (de 10^6 a 10^8 ufc/g) (Danone Vitapole, 2002).

Varias cepas de la flora intestinal tienen características putrefactivas o patogénicas en diverso grado; estos microorganismos también se denominan “bacterias patógenas” y pueden producir sustancias dañinas para el huésped, especialmente algunas sustancias putrefactivas como amoníaco, sulfuro de hidrógeno, aminas, fenoles, indoles y ácidos biliares secundarios. Este es el caso de *Escherichia coli*, una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, asociada a enfermedades en muchas partes del cuerpo. La meningitis y la diarrea del viajero son algunas de las enfermedades causadas por este microorganismo patógeno. Como parte de la microflora intestinal tiene un papel fundamental en la digestión produciendo vitamina K a partir de los restos de comida no digeridos en el intestino grueso (Danone Vitapole, 2002).

Los microorganismos que pertenecen a la flora intestinal endógena ejercen una importante influencia para mantener el estado adecuado de la comunidad microbiológica. Diversos factores vinculados al huésped, las bacterias y el entorno contribuyen a mantener una composición adecuada y un buen funcionamiento de la flora intestinal. A su vez, la flora intestinal produce una amplia variedad de enzimas que cumplen una gran cantidad de funciones metabólicas en el intestino e influyen sobre la salud y la evolución de las enfermedades del huésped (Danone Vitapole, 2002).

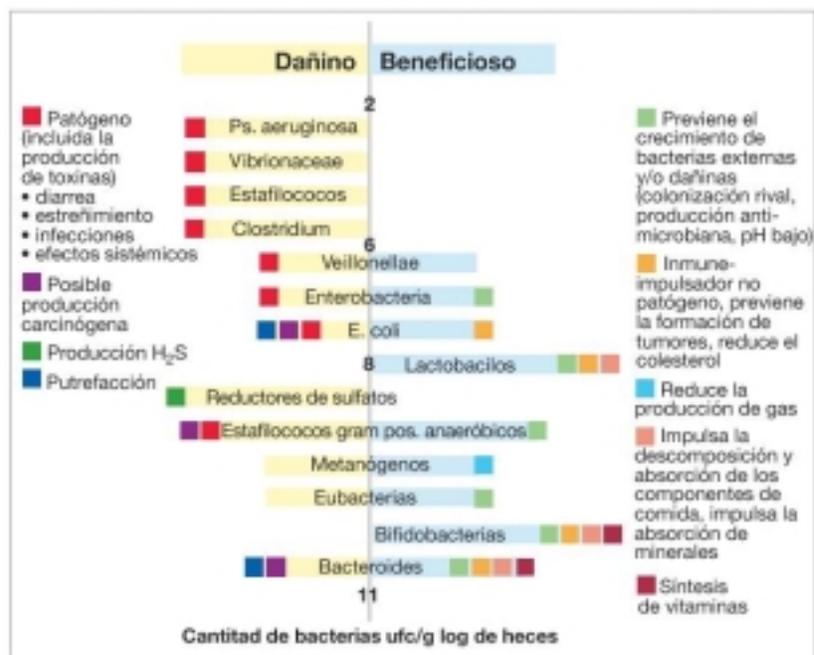


Figura 4. Microorganismos de la Microflora Intestinal Humana (Saxelin, 2002)

2.4.3. Simulación *in vitro* del tracto gastrointestinal

El interés por estudiar el comportamiento de las bacterias existentes en el aparato digestivo ha llevado a especialistas a diseñar diversas formas de simular cada una de sus regiones. De acuerdo a la tabla 2, cada autor diseña su propio simulador del ecosistema intestinal microbiano, tratando de asemejarse lo más posible a las condiciones existentes en esta parte del cuerpo:

| Simulación <i>in vitro</i> | Condiciones de Simulación |
|--|--|
| Desarrollo de un Reactor Multi-Cámara para la simulación del Ecosistema Microbiano Intestinal Humano. (Molly <i>et al.</i> , 1993) | Se desarrolló un reactor de 5 cámaras (figura 5) para simular el tracto gastrointestinal humano; el intestino delgado consiste en dos vasos; mientras que el intestino grueso consiste en tres vasos. El reactor tuvo agitación constante (150 rpm), la temperatura se mantuvo a 37°C. El pH de los vasos 2, 3, 4 y 5 estuvo controlado entre 6.5 y 7.0, 5.5 y 6.0, 6.0 y 6.4 y 6.4 y 6.8 respectivamente. |
| Reactor de Simulación del Ecosistema Microbiano Intestinal Humano. (Gmeiner <i>et al.</i> , 2000) | El reactor consiste en seis vasos cerrados simulando las diferentes partes del tracto gastrointestinal humano, conectado en serie en el siguiente orden: el estómago, el duodeno, el intestino delgado, el colon ascendente, el colon transversal y el colon descendente. La microflora residente en los diferentes vasos consiste en una mezcla de bacterias de origen humano. La temperatura se mantuvo a 37°C. El pH de los tres últimos vasos fue controlado entre 5.5 y 6.0, 6.0 y 6.4 y 6.4 y 6.8 respectivamente. El objetivo del estudio fue monitorear los cambios en la densidad de la población de especies de bacterias seleccionadas en el intestino durante la suplementación de <i>L. acidophilus</i> y un fructooligosacárido. La adición de ambos componentes, dio como resultado un incremento en el número de bifidobacterias y un aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta. |
| Sistema Continuo de Cultivo de Tres Etapas para el estudio del efecto del tiempo de retención en Bacterias del Colon Humano. (Macfarlane <i>et al.</i> , 1998) | El sistema de cultivo continuo consiste en tres recipientes V1, V2 y V3 (figura 6) con pH de 5.5, 6.2 y 6.8 respectivamente. Cada fermentador se mantuvo con agitación bajo una atmósfera de CO ₂ . El medio de cultivo fue alimentado mediante bombas peristálticas a cada uno de los fermentadores. El sistema fue diseñado para reproducir espacial, temporal y fisicoquímicamente las características de la microbiota en el colon ascendente, colon transversal y descendente para estudiar el efecto del tiempo de retención en el catabolismo de las fuentes de carbono. Los resultados muestran que la mayor parte de los carbohidratos se degradan en el colon ascendente y que la fermentación de aminoácidos aromáticos se ven afectados por el tiempo de retención. |

Tabla 2. Estudios de Simulación *in vitro* del Tracto Gastrointestinal humano

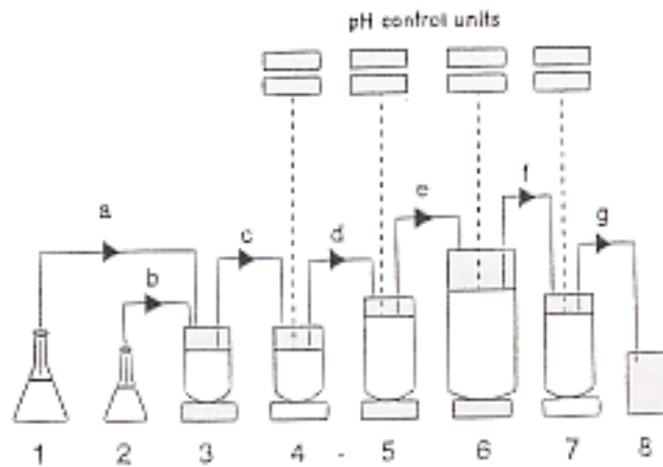


Figura 5. Simulación In vitro del Tracto Gastrointestinal Humano: 1, alimentación; 2, polvo pancreático; 3, reactor 1 (duodeno y yeyuno); 4, reactor 2 ileon; 5; reactor 3 (colon ascendente); 6, reactor 4 (colon transversal); 7, reactor 5 (colon descendente); 8, efluente. Bombas a-d operadas en semicontinuo; bombas e-g operadas en continuo. (Molly et al., 1993).

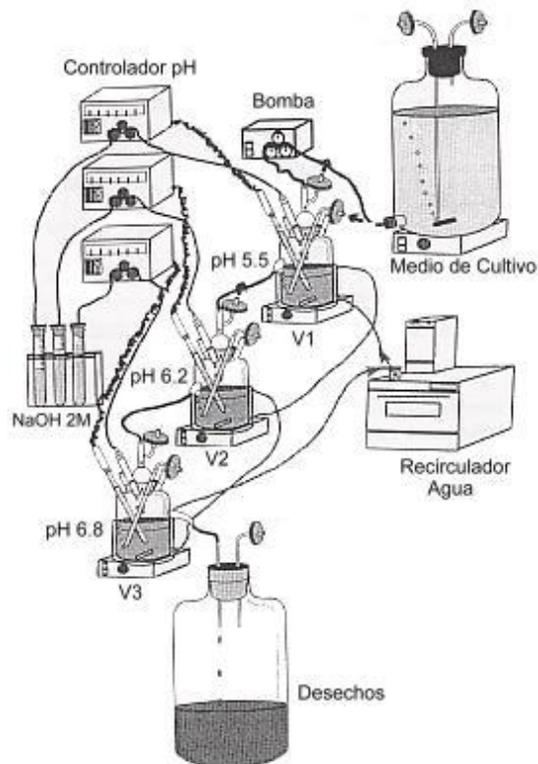


Figura 6. Sistema de Cultivo Continuo de Tres Etapas: V1, Colon Ascendente; V2, Colon Transversal; V3, Colon Descendente (Macfarlane et al, 1998).

2.4.4 Efecto de prebióticos en el crecimiento de los microorganismos probióticos

Existe evidencia científica de que algunos compuestos prebióticos promueven el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el colon (Kneifel, *et al.* 2000). Se ha reportado que muchos oligosacáridos poseen actividad prebiótica, estos datos se obtienen siempre de estudios en los que el oligosacárido es comparado con un placebo en estudios *in vitro* o en estudios con humanos; en un estudio en el que se monitorea por 24 horas el crecimiento de diferentes bacterias probióticas en diferentes prebióticos, se obtuvo que todos los prebióticos utilizados incrementaron el número de bifidobacterias y lactobacilos. Los xilooligosacáridos y la lactulosa incrementan el número de bifidobacterias, mientras que los fructooligosacáridos producen las poblaciones más altas de lactobacilos (Rycroft *et al.*, 2001). Como se muestra en la tabla 3, la 2-4´galactosil-lactosa es utilizada selectivamente por varias cepas de bifidobacterias y lactobacilos, resultados similares se obtienen con lactulosa en experimentos *in vitro* (Sako, 1999).

| | No. de Cepas | Glucosa (control) | 4´galactosil-lactosa | Lactulosa |
|-------------------------------------|--------------|-------------------|----------------------|-----------|
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | 3 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 6 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Bifidobacterium breve</i> | 3 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> | 2 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 2 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 2 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 1 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | 2 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 2 | ++ | ++ | ++ |
| <i>Clostridium difficile</i> | 1 | ++ | - | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 3 | ++ | - | + |
| <i>Escherichia coli</i> | 6 | ++ | - | +- |

Tabla 3 Crecimiento de bacterias: ++: igual a glucosa; +: menos que en glucosa; + -: crecimiento escaso; -: sin crecimiento (Modificada de Sako, 1999).

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento de bacterias probióticas en presencia de coliformes utilizando prebióticos como agentes selectivos.

4. MATERIAL Y METODOLOGIA

4.1. Microorganismos

Se utilizaron cepas de *Lactobacillus casei* Shirota aislada de Yakult y *Escherichia coli* (cepa silvestre), las cuales se mantuvieron por propagación en leche descremada y agar nutritivo respectivamente. Los cultivos son almacenados a 4°C.

Los cultivos fueron resembrados antes de ser usados en cada experimento. *Lactobacillus casei* Shirota se creció en 50 mL de caldo MRS a 35°C durante 24 horas. *Escherichia coli* se creció en 50 mL de caldo nutritivo a 35°C durante 24 horas.

4.2 Simulación del Ecosistema Intestinal Microbiano Humano

La simulación consistió en la utilización de recipientes cerrados para las diferentes partes del tracto gastrointestinal con las condiciones indicadas en la tabla 4.

| Región Simulada | Condiciones | Tiempo de Residencia (h) |
|-------------------|--|--------------------------|
| Intestino Delgado | Temperatura 37°C; pH 7.2; agitación 150 rpm. | 4 |
| Colon Ascendente | Temperatura 37°C; pH 5.5; agitación 150 rpm. | 8 |
| Colon Transversal | Temperatura 37°C, pH 6.2; agitación 150 rpm. | 12 |
| Colon Descendente | Temperatura 37°C, pH 6.8; agitación 150 rpm. | 10 |

Tabla 4. Condiciones de Simulación (Modificadas de Macfarlane et al., 1998).

Las regiones del aparato digestivo se simularon por separado dando continuidad al experimento mediante la transferencia de un inóculo de 1 mL de medio de cultivo de región en región.

El medio para el crecimiento fue preparado tomando como base el medio descrito por Molly *et al* (1993). El medio contenía en (g/L): glucosa, 0.4; extracto de levadura, 3; proteosa-peptona, 1; NaHCO₃, 0.4; NaCl, 0.08; K₂HPO₄, 0.04; KH₂PO₄, 0.04; CaCl₂, 0.008; MgSO₄•7H₂O, 0.008; Tween 80, 1mL/L. El pH inicial del medio fue de 7.1-7.2 y se ajustó al pH correspondiente para cada región con soluciones de HCl 0.1 N.

4.3. Cuantificación del crecimiento microbiano

El fermentador (50mL) se inoculó con cultivos de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli*. El medio control contenía glucosa, mientras que el medio de prueba contenía Oligomato 55[®] como fuente de carbono. Las muestras se tomaron periódicamente para determinar el número de organismos viables en el tiempo de incubación determinado para cada parte del tracto gastrointestinal simulada.

4.3.1. Enumeración de Bacterias

Se prepararon diluciones seriales de cada muestra utilizando agua peptonada al 0.5%; de 10⁻¹ a 10⁻⁷ y 10⁻¹ a 10⁻⁸ para el intestino delgado y el colon ascendente respectivamente, y de 10⁻¹ – 10⁻¹⁰ para el colon transversal, y 10⁻¹ – 10⁻¹¹ para el colon descendente. Con medios selectivos, se empleó la técnica de siembra en placa (Agar EMB) y siembra en placa vertida (Agar MRS: caldo MRS + 2% de Agar Bacteriológico) para *Escherichia coli* y *Lactobacillus casei* Shirota respectivamente. Las placas fueron incubadas a 35°C por 24 horas.

4.3.2. Análisis Estadístico

Para el análisis de los resultados, se llevo a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando el software estadístico NCSS (2001) para cada una de las regiones simuladas.

5. RESULTADOS

Se realizó una fermentación de 32 horas de duración, en la cual se simularon el intestino delgado, el colon ascendente, el colon transversal y el colon descendente en las condiciones reportadas en la tabla 4. Los resultados del experimento se expresan a través del número de unidades

formadoras de colonias/mL (ufc/mL) mediante la siembra en placa (figuras 7 y 8) de cada uno de los microorganismos estudiados.



Fig. 7 Colonias de *Lactobacillus casei* Shiota en Agar MRS.

Fig. 8 Colonias de *Escherichia coli* en Agar EMB

5.1. Intestino Delgado

En una fermentación con una duración de 4 horas, se llevó a cabo la simulación del intestino delgado; el medio de cultivo control con glucosa como fuente de carbono tuvo un pH inicial de 7.2 y un pH final de 7.0; el medio de cultivo con Oligomato 55[®] tuvo un pH inicial de 7.2 y un pH final de 6.0. El número inicial de ufc/mL para *Lactobacillus casei* Shiota fue de 6×10^7 en glucosa (figura 9) y de 3×10^7 en oligomato (figura 10), mientras que el número de ufc/mL final fue de 1.85×10^9 y 4.75×10^9 en glucosa y oligomato respectivamente.

Para el caso de *Escherichia coli* el número de ufc/mL inicial fue de 1.3×10^7 y el final de 3×10^8 y de 5×10^6 ufc/mL iniciales y 3×10^8 al final, para glucosa y oligomato. El análisis estadístico muestra que en el caso del crecimiento en glucosa, existen diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre ambos microorganismos para los tiempos 3 y 4 de la fermentación; en el caso del medio de cultivo con Oligomato 55[®], las diferencias se presentan desde las dos horas de iniciada la fermentación. De igual forma se observa que el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shiota fue mayor en Oligomato 55[®] que en glucosa.

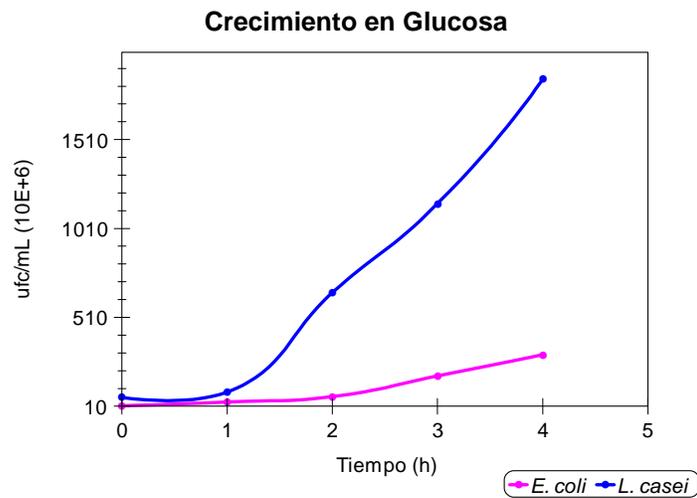


Fig. 9 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el Intestino Delgado.

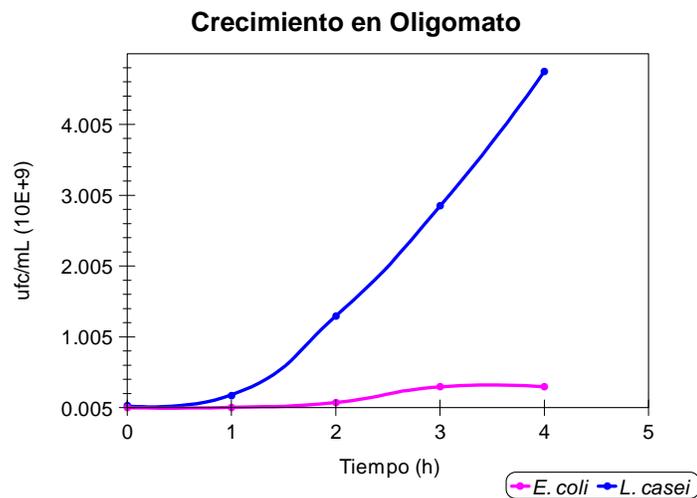


Fig. 10 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el Intestino Delgado.

5.2. Colon Ascendente

El número de ufc/mL de *Lactobacillus casei* Shirota fue de 6×10^7 al inicio y 9×10^8 al final de la fermentación con una duración de 8 horas en el medio con glucosa (figura 11), para el caso del medio con Oligomato 55[®] (figura 12) el número inicial de ufc/mL fue de 1.05×10^8 y el final de 3.4×10^9 . El medio con glucosa u Oligomato 55[®] tiene un pH inicial de 5.5; el pH final del medio fue de 5.0 y 4.0 para glucosa y Oligomato 55[®] respectivamente. El número inicial de ufc/mL de *Escherichia coli* fue de 4×10^6 en glucosa y 8×10^6 en Oligomato 55[®]; el número final de ufc/mL fue de 9×10^7 en glucosa y 1.3×10^8 en Oligomato 55[®]. De acuerdo al análisis estadístico, existen

diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre el crecimiento de ambos microorganismos para ambas fuentes de carbono en los tiempos 4, 6 y 8 de la fermentación. El crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota fue mayor en el medio que contiene Oligomato 55[®].

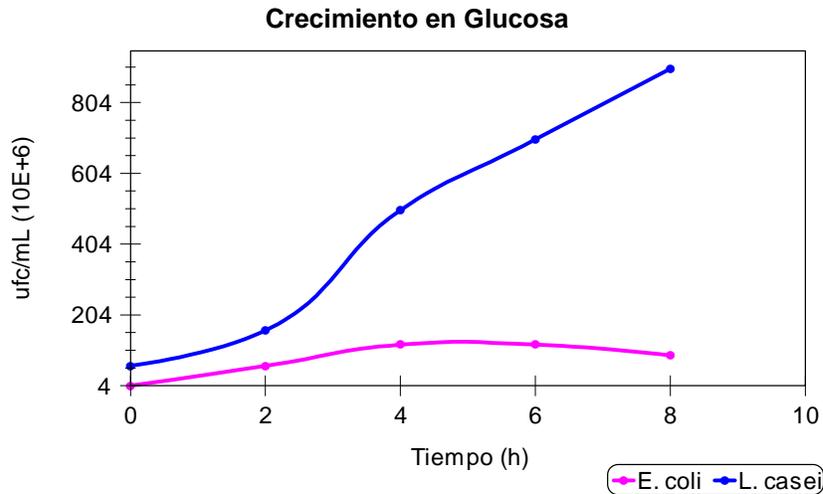


Fig. 11 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el Colon Ascendente.

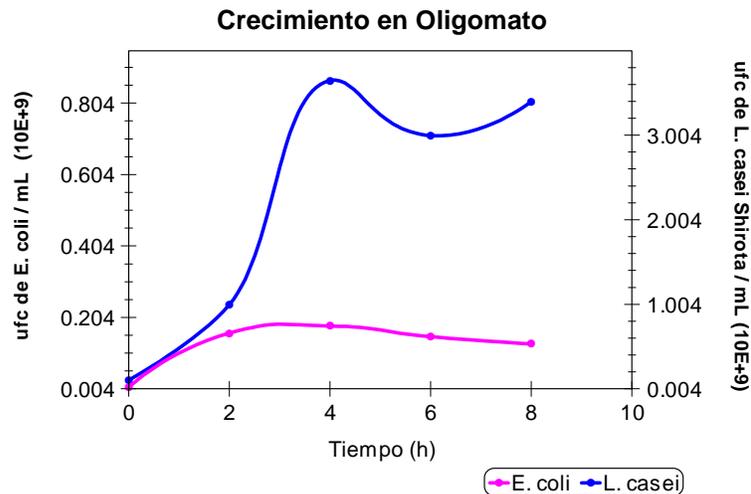


Fig. 12 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el Colon Ascendente.

5.3 Colon Transversal

Se realizó una fermentación de 12 horas para simular el colon transversal de la cual se obtuvo el número de ufc/mL para cada medio y microorganismo estudiado. El número de ufc/mL para *Lactobacillus casei* Shirota fue de 2×10^7 al inicio y de 1.5×10^{10} al final de la fermentación con glucosa y de 6.95×10^7 al inicio y 5.5×10^{10} al final de la fermentación con Oligomato 55[®] (figuras 13

y 14). De la misma manera se obtuvo el número de ufc/mL para *Escherichia coli* siendo de 3×10^6 y 3.3×10^6 en glucosa y oligomato respectivamente para el inicio de la fermentación y de 7×10^7 y 3.2×10^8 al final de la misma. El análisis estadístico muestra diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre ambos microorganismos para los tiempos 10 y 12 en glucosa y para los tiempos 8, 10 y 12 en Oligomato 55[®]. El mayor crecimiento fue el de *Lactobacillus casei* Shirota en Oligomato 55[®].

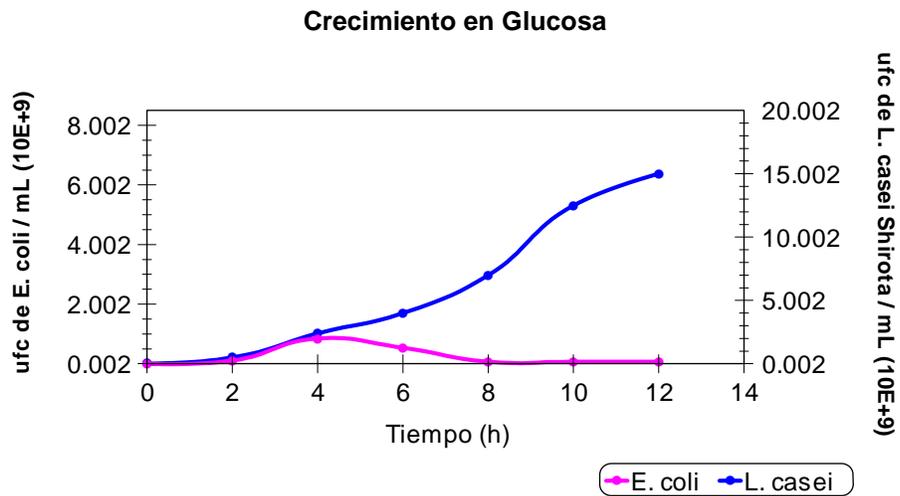


Fig. 13 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en Colon Transversal.

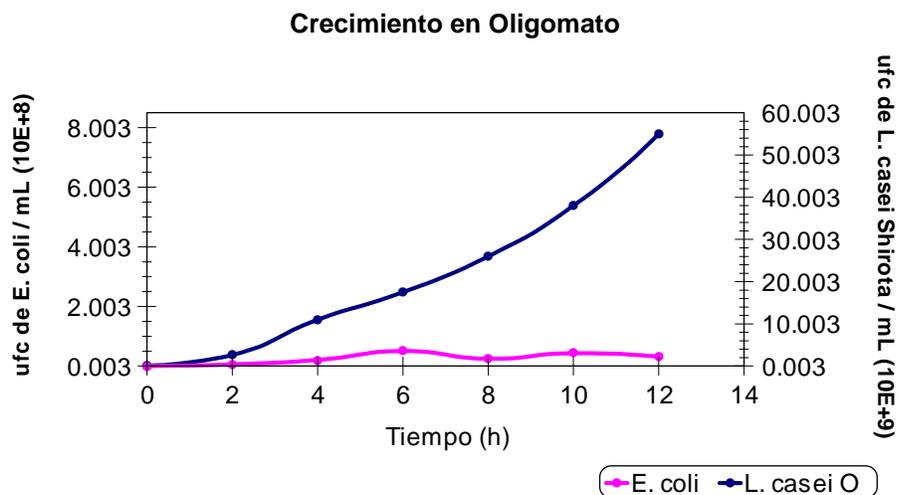


Fig. 14 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el Colon Transversal.

5.4 Colon Descendente

Para simular el colon descendente, se realizó una fermentación de 10 horas de la cual se obtuvo el número de ufc/mL para cada medio y microorganismo estudiado. El número de ufc/mL para

Lactobacillus casei Shirota fue de 3.5×10^7 al inicio y de 3.5×10^{11} al final de la fermentación con glucosa (figura 15) y de 7×10^7 al inicio y 1.1×10^{12} al final de la fermentación con Oligomato 55[®] (figura 16). De la misma manera se obtuvo el número de ufc/mL par *Escherichia coli* siendo de 3.5×10^6 y 1.3×10^7 en glucosa y Oligomato 55[®] respectivamente para el inicio de la fermentación y de 9×10^7 y 2.6×10^8 al final de la misma. El análisis estadístico muestra diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre ambos microorganismos para los tiempos 8 y 10 en glucosa y para los mismos tiempos en Oligomato 55[®]. El mayor crecimiento fue el de *Lactobacillus casei* Shirota en Oligomato 55[®].

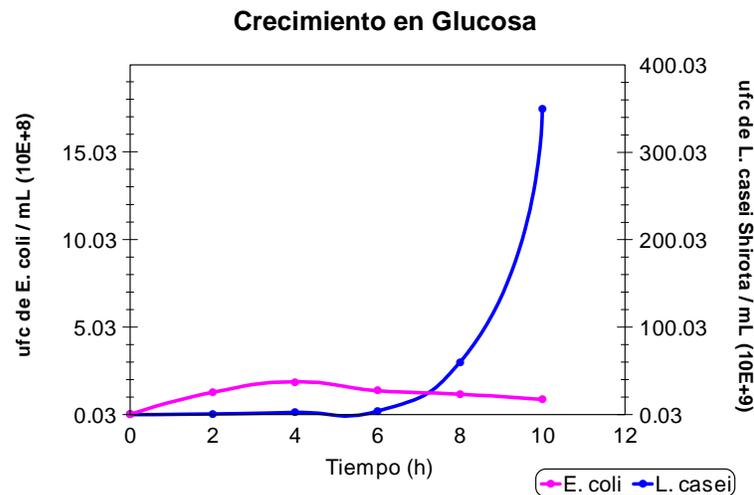


Fig. 15 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el Colon Descendente.

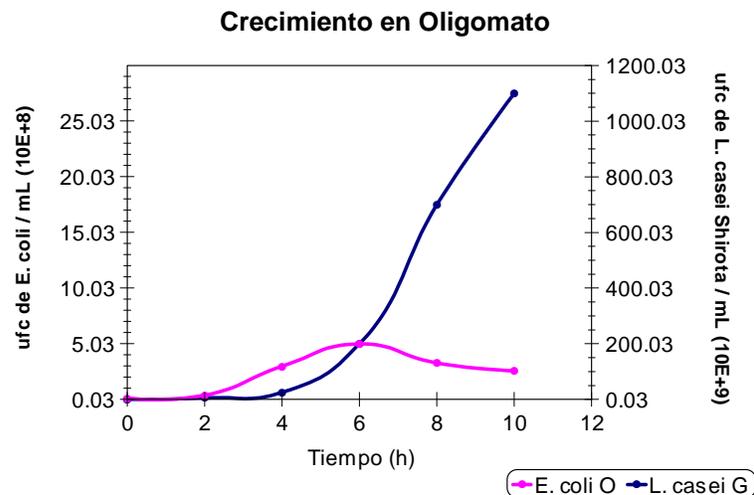


Fig. 16 Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el Colon Descendente.

5.5 Comparación del Crecimiento en las Regiones Simuladas

En la figura 17, se observa el crecimiento de los microorganismos estudiados con los medios de cultivo con ambas fuentes de carbono; para el caso de *E. coli* en las dos fuentes de carbono (glucosa y Oligomato 55[®]) el crecimiento se mantiene muy constante para todas las regiones; es decir, el número de ufc/mL no aumenta durante el transcurso de la fermentación de 32 horas, incluso cuando se llega a colon ascendente el número de ufc/mL en glucosa disminuye. Contrario al comportamiento de *E. coli*, el crecimiento de *L. casei* Shirota disminuye en el colon ascendente siendo esta región la que presenta el menor crecimiento (ufc/mL), pero aumenta para las dos últimas regiones (colon transversal y descendente) siendo significativamente diferente en la última región para ambas fuentes de carbono glucosa y Oligomato 55[®], siendo éste último en el cual se observa el mayor crecimiento.

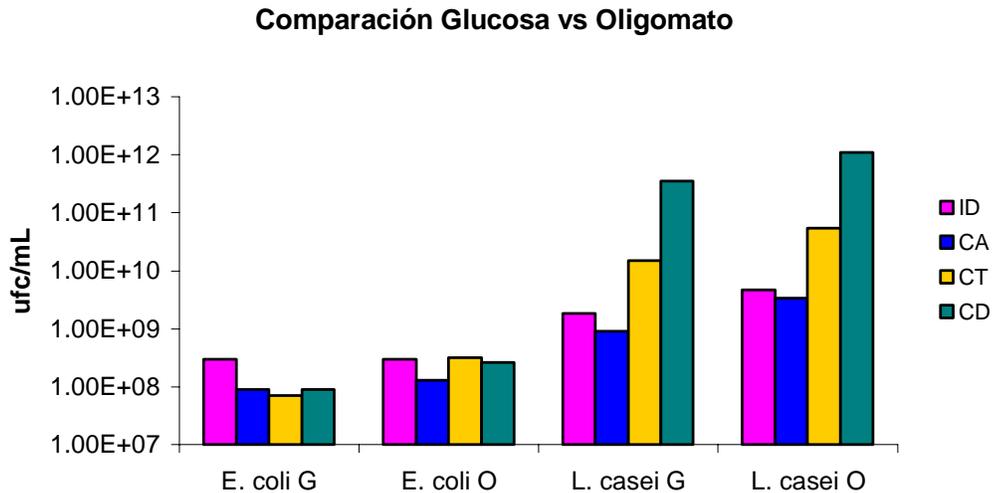


Fig. 17 Comparación de crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en diferentes sustratos. Glucosa (G) y Oligomato (O). ID: Intestino Delgado; CA: Colon Ascendente; CT: Colon Transversal; CD: Colon Descendente; G: Glucosa; O: Oligomato.

La figura 18 muestra el comportamiento de cada microorganismo en las regiones simuladas; se observa claramente la diferencia en el crecimiento de *L. casei* Shirota que sobresale en todas las regiones, tanto para glucosa como para Oligomato 55[®], siendo siempre mayor el número de ufc/mL en este último.

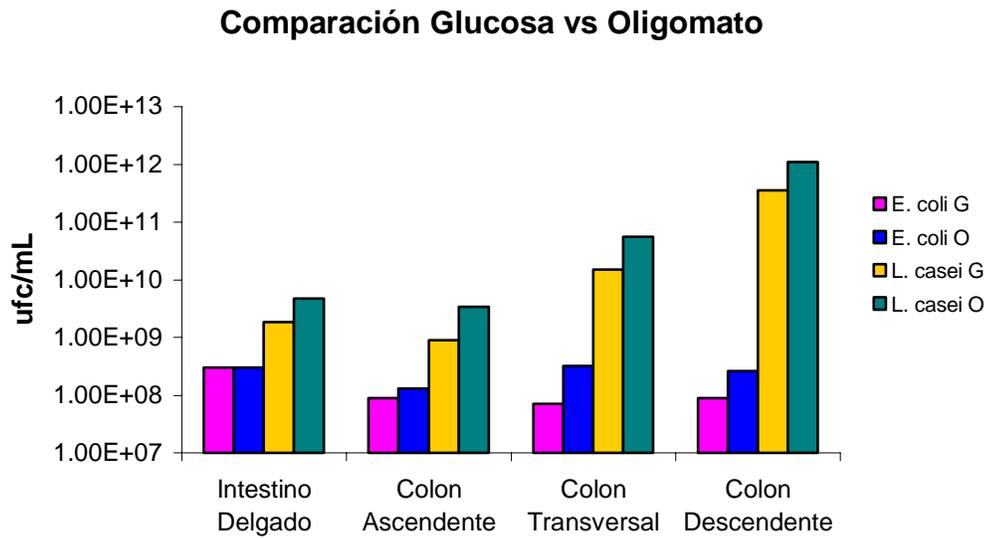


Fig. 18 Comparación de crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota cada región simulada del tracto gastrointestinal en diferentes sustratos.

G: Glucosa; O: Oligomato.

5.6 Velocidad de Crecimiento

La tabla 5 muestra las velocidades de crecimiento para cada uno de los microorganismos en las regiones simuladas; se observa que la velocidad de crecimiento de *L. casei* Shirota se incrementa en el medio que contiene Oligomato 55[®] como fuente de carbono en todas las regiones; el comportamiento de *E. coli* no muestra una tendencia clara.

| | Intestino Delgado | Colon Ascendente | Colon Transversal | Colon Descendente |
|-------------------------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|
| Microorganismo | Velocidad de Crecimiento μ (min⁻¹) | | | |
| <i>E. coli</i> (Glucosa) | 0.0132 | 0.0142 | 0.0235 | 0.0166 |
| <i>E. coli</i> (Oligomato) | 0.0193 | 0.013 | 0.0173 | 0.0131 |
| <i>L. casei</i> Shirota (Glucosa) | 0.0157 | 0.0088 | 0.0199 | 0.0178 |
| <i>L. casei</i> Shirota (Oligomato) | 0.0214 | 0.0148 | 0.0211 | 0.0245 |

Tabla 5. Velocidad de Crecimiento

6. DISCUSION

Si se comparan las gráficas de crecimiento en glucosa y Oligomato 55[®], se observa que el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota se incrementa utilizando el Oligomato 55[®] como fuente de carbono; esto se observa a través del aumento en el número de unidades formadoras de colonias/mL en cada una de las regiones simuladas. El crecimiento de *E. coli* tiene un comportamiento diferente al del *Lactobacillus casei* Shirota ya que el número de ufc/mL permanece prácticamente constante, alrededor de 4.0×10^8 para el caso de Oligomato 55[®] y de 1.00×10^9 para glucosa. Un efecto adicional asociado con un mayor crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota es la disminución del pH final del medio de cada región cuando se utiliza oligomato como fuente de carbono mientras que para glucosa, el pH es muy similar al inicial. Goñi (2000) reporta que con la fermentación de prebióticos, se producen AGCC, baja el pH y disminuye la proliferación de bacterias perjudiciales. De lo anterior se puede explicar el hecho de que el número de ufc/mL de *Escherichia coli* no aumente con el paso del tiempo. De acuerdo a lo reportado por Escalante (2001) de que en estudios controlados en los que los oligosacáridos transgalactosilados fueron administrados a ratas con intestinos colonizados con flora bacteriana humana, se observó que los niveles de bifidobacterias y lactobacilos se incrementaron significativamente, disminuyendo niveles de enterobacterias, lo que explica el aumento en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota. El análisis estadístico de cada región por separado, muestra que para el intestino delgado existen diferencias significativas entre el crecimiento de ambos microorganismos a las 4 horas de la fermentación. De igual forma, se observa que existe diferencia entre el número de unidades formadoras de colonias/mL de *Lactobacillus casei* Shirota cuando crece en glucosa y en Oligomato 55[®], siendo éste último en el que el número de ufc/mL es mayor. Para el colon ascendente, el análisis arroja un resultado muy similar al de la región anterior, después de las 4 horas de fermentación y hasta el final de la misma, existe diferencia entre ambos microorganismos en las dos fuentes de carbono, la diferencia es que el mayor número de ufc/mL en glucosa es hasta las 8 horas de fermentación, mientras que para el Oligomato 55[®] el mayor número de ufc/mL se presenta a las 4 horas disminuyendo durante las 4 horas siguientes; sin embargo, a pesar de esta disminución, el mayor número de ufc/mL se presenta en el medio con Oligomato 55[®]; esto con respecto al crecimiento de cada microorganismo en ambas fuentes de carbono, al igual que para el intestino delgado en donde no existe diferencia significativa en el crecimiento de *E. coli*. Para tratar de explicar la disminución en el número de ufc/mL que se presenta en el colon ascendente se calcularon las velocidades de crecimiento para ambos microorganismos en cada una de las

regiones y para cada uno de los sustratos; como se observa en la tabla 5, la velocidad de crecimiento en glucosa de *L. casei* Shirota es muy baja en comparación con el resto de sus velocidades en las otras regiones, por lo tanto, haciendo referencia a lo reportado por Wang y Gibson, 1993: la velocidad de crecimiento de las bacterias ácido lácticas disminuye conforme disminuye el pH, obteniendo las velocidades más altas a pH de 7.0 y las más bajas a 5.0, dejando de observarse crecimiento a pH de 4.0, así se explica que el crecimiento en el colon ascendente con pH de 5.5 sea menor, aunque se observa un aumento de la velocidad cuando el medio de cultivo contiene Oligomato 55[®], pero de igual forma, es en esta región en la que la velocidad es la más baja aún con esta fuente de carbono. En el colon transversal, la diferencia entre ambos microorganismos es significativa para el tiempo 10 y 12h de la fermentación en glucosa y para los tiempos 8, 10 y 12h en Oligomato 55[®], siendo en éste en donde se presenta el mayor número de ufc/mL. Al igual que en las dos regiones anteriores, existe diferencia significativa en la comparación del crecimiento de *L. casei* Shirota en ambas fuentes de carbono, siendo mayor el crecimiento en Oligomato 55[®]. En la última región, el colon descendente, existen diferencias significativas para los tiempos 8 y 10h de cada fermentación, manteniéndose la característica de que el mayor número de ufc/mL es de *L. casei* Shirota, como en el colon transversal, existen diferencias en el crecimiento del mismo microorganismo entre ambas fuentes de carbono, y el número de ufc/mL de *L. casei* Shirota es mayor en Oligomato 55[®] que en glucosa.

7. CONCLUSIONES

El Oligomato 55[®] mostró un efecto de estimulación sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota cuando este se encuentra en un medio combinado con *Escherichia coli*.

El efecto de estimulación que ejerce el Oligomato 55[®] sobre el crecimiento se presentó en cada una de las regiones simuladas, manifestándose a través de un mayor número de ufc/mL de *Lactobacillus casei* Shirota que de *Escherichia coli*.

El oligomato no ejerció un efecto de estimulación sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

Bajo las condiciones establecidas para la simulación, no se observó disminución en el número de ufc/mL de *Escherichia coli* el cual permanece constante en todas las regiones simuladas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Cagigas, A. L. y J. Blanco. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 16 (1):63-68.
- Crittenden R. G. y M. J. Playne. 1996. Production, properties and applications of Food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science and Technology. 7: 353-361.
- Danone Vitapole. 2002. "The World of Microbes". Número Especial. 10° Congreso Internacional de Bacteriología y Microbiología Aplicada. París.
- Escalante, L. A. 2001. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 21 (3): 106-114.
- Fooks, J. L., Fuller R., y G. R. Gibson. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. International Dairy Journal. 9: 53-61.
- Fox, P. F. y A. Flynn. 1992. Biological properties of milk proteins. En: Advanced Dairy Chemistry Vol. 1 Proteins. Elsevier Applied Science, London, pp. 155-248.
- Gibson, R. G. y M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. 125: 1401-1412.
- Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe K. D., Wouters, R., De Boever P., Nollet, L. y W. Verstraete. 2000. Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). Applied Microbiology and Biotechnology. 53: 219-223.
- Gomes, M. P. A. y F. X. Malcata. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology. 10: 139-157.
- Goñi, I. 2000. Prebióticos en nuevos alimentos. Nutrición. 1 (5): 1-4.

- Gopal, K. P., Sullivan, A. P y B. J. Smart. 2000. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal*. 11: 19-25.
- Guyton, A. C. 1992. *Tratado de Fisiología Médica*. 8ª. Edición. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA. España. 1063 pp.
- Hopkins, J. M., Cumming H. J. y G. T. Macfarlane. 1998. Inter.-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 381-386.
- Kailasapathy, K. y J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*. 78: 80-88.
- Kneifel, W., Rajal, A. y K. D. Kulbe. 2000. *In vitro* growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health Disease*. 12: 27-34.
- Lee, Y. J. y S. Salminen. 1995. The coming age of probiotic. *Trends in Food Science and Technology*. 6:241-245.
- Macfarlane G. T., Macfarlane S. y G. R. Gibson. 1998. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigate the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microbial Ecology*. 35: 180-187.
- Millar, J. B., Bull, S., Miller, J. y P. McVeagh. 1994. The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variation in monosaccharide components. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 19: 371-376.
- Molly, K., Vande Woestyne, M. y W. Verstraete. 1993. Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39: 254-258.

- Nakhla, T., Fu, D., Zopf, D., Brodsky, N. y H. Hurt. 1999. Neutral oligosaccharide content of preterm human milk. *British Journal of Nutrition*. 82: 361-367.
- Ouwehand C. A., Kirjavainen, V. P., Shortt, C. y S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 9: 42-52.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R. y R. A. Rastall. 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 878-887.
- Sako, T., Matsumoto, K. y R. Tanaka. 1999. Recent progress on research and application of non digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 9: 69-80.
- Saloff-Coste, C. J. 1997. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud, pp. 6-10.
- Saxelin, M. 2002. LGG Summatim. 2ª. Edición Editorial Ekholmin Kirjapaino Oy, Finlandia. 61 pp.
- Tomomatsu, H. 1994. Health Effects of Oligosaccharides. *Food Technology*. pp.61-63.
- Voragen, G. J. A. 1998. Technological aspects of functional Food-related carbohydrates. *Trends in Food Science and Technology*. 9: 328-335.
- Walzem, L. R., Dillard, J. C. y J. B. German. 2002. Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: GAT We Know May Overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42 (4): 353-375.
- Wang, X. y G. R. Gibson. 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 373-380.
- Yakult Oligomate 55® (Bifidus growth-promoting substance). Yakult Pharmaceutical Industry Co., LTD.

Yun, W. J. 1996. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 107-117.

<http://www.saludalia.com/fisiologiaaparato digestivo>

<http://www.yakult.com.mx/nuestrasalud/floraintestinal>