



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Construcción de un modelo de colon proximal
humano para el estudio de prebióticos**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

Presenta

Román Jiménez Vera

Directores

Dra. Alma Corona Cruz

Dr. Mariano García Garibay

México, D. F., 19 de Marzo de 2009

Iztapalapa, D. F., 19 de Marzo de 2009

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

Construcción de un modelo de colon proximal humano para el estudio de prebióticos

que presentó

Román Jiménez Vera

Comité tutorial

Directores: Dr. José Mariano García Garibay
Biotecnología, UAM Iztapalapa

Dra. Alma Irene Corona Cruz
Facultad de Ingeniería Química, UADY

Asesor: Dr. Óscar Monroy Hermosillo
Biotecnología, UAM Iztapalapa

Sinodales: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero
Biotecnología, UAM Iztapalapa

Dra. Flor de María Cuervo López
Biotecnología, UAM Iztapalapa

Dra. Rina María González Cervantes
Biotecnología, UAM Xochimilco

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que participaron en la realización de este trabajo, quienes con gran espíritu de colaboración compartieron conmigo sus percepciones, conocimientos e información para que este trabajo fuera posible. Agradezco de manera especial a la Dra. Alma Corona Cruz, al Dr. Mariano García Garibay y al Dr. Óscar Monroy Hermosillo por su apoyo en todo momento. De igual manera a la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por su colaboración en el inicio de este proyecto.

A todas las instituciones que apoyaron financieramente o colaboraron con sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación: a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (CBS-UAMI), a la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (FIQ-UADY) y a la División Académica Multidisciplinaria de los Ríos de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DAMR-UJAT). Mi agradecimiento a las autoridades universitarias por su apoyo y confianza.

Al Comité de Revisión por sus valiosas observaciones que contribuyeron a enriquecer este trabajo: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero, Dra. Flor de María Cuervo López, Dra. Rina María González Cervantes y Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

Al grupo de trabajo de la Planta Piloto 2 de la UAM Iztapalapa y del Laboratorio de Biotecnología de la FIQ-UADY, por permitirme usar sus instalaciones y por hacerme sentir parte importante de su grupo.

A mis amigos del Cuerpo Académico: Maestros Nicolás, Magaña, Cuenca y Vera, a mi familia y mis alumnos, por compartir su entusiasmo por mi trabajo y comprender mis largos viajes...

Para todos, gracias!

A mi familia y mis amigos... en especial a Mamá y Papá

RESUMEN

El colon proximal humano es la región del intestino grueso donde se ha reportado e mayor efecto prebiótico, sin embargo, no es un sitio fácilmente accesible para estudios de rutina. Para realizar estudios de ecología microbiana en esta región se han desarrollado modelos de laboratorio que imitan algunas características del sistema digestivo. El objetivo de este trabajo fue construir un modelo de laboratorio con las condiciones de fermentación y absorción del colon proximal humano, así como determinar la respuesta a la adición de inulina, almidón resistente de plátano y fibra dietética de naranja. El modelo se construyó empleando un tubo de vidrio (50 x 5 cm) con una membrana de diálisis en su interior. El sustrato se introdujo en la membrana de diálisis tres veces al día, simulando una alimentación humana típica. La composición del sustrato incluyó 58% de carbohidratos, 35% de proteínas, 3% de fibra, 3% de almidón, y 1% de lípidos en base seca, con el 90% de humedad. Como inóculo se utilizó un cultivo de biomasa fecal propagado en caldo de soya y tripticaseína (TSB). La absorción intestinal fue simulada mediante el flujo continuo de una solución de polietilenglicol (PEG) alrededor de la membrana de diálisis. Se logró el cultivo de biomasa fecal para su empleo como inóculo. El inóculo se obtuvo con una concentración de microorganismos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) semejante a la encontrada en solución fecal. Con la propagación se mejoraron las condiciones de manejo y transporte, se aumentó la concentración de microorganismos anaerobios y se eliminó la interferencia por sustancias desconocidas. En el modelo del colon proximal se obtuvo crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios así como producción de ácidos grasos de cadena corta en concentraciones similares a las reportadas por otros autores para la región del colon. Todos los microorganismos aumentaron su cuenta después de la inoculación del sustrato y se obtuvo el mayor crecimiento después de cada alimentación. La concentración de AGCC dentro y fuera de la membrana fue significativamente diferente debido a la eficacia de extracción de la solución de PEG. La mayor producción se obtuvo a las 48 h. Al principio, el acetato fue el compuesto predominante, pero después de 12 h la proporción de butirato aumentó y el acetato disminuyó. Esta producción de AGCC fue similar a la del colon proximal en los sistemas vivos. El funcionamiento continuo del modelo del colon durante 48 h fue suficiente para obtener un buen desarrollo de microorganismos y la producción de AGCC. Este modelo reproduce las condiciones del ser humano de colon proximal de manera adecuada y puede ser utilizado para estudiar el desarrollo de la microbiota colónica. La

adición de inulina en el modelo provocó el aumento en la concentración de anaerobios totales y facultativos, así como en lactobacilos y bifidobacterias. Aunque en la concentración de mesófilos aerobios se presentó un aumento, en coliformes y enterobacterias hubo una disminución en la concentración. La concentración de clostridios se mantuvo igual tanto a las 24 h como a las 48 h; su crecimiento no fue afectado por la adición de inulina. Se demostró la sensibilidad del sistema modelo del colon para mostrar pequeños cambios que ocurren en el metabolismo de la microflora colónica ante un estímulo alimenticio como lo es la adición de inulina. Se obtuvo la caracterización fisicoquímica y funcional de almidón resistente de plátano y fibra dietética de naranja. El almidón de plátano *Musa balbisiana* Colla contiene más de la mitad de almidón resistente a la digestión. La harina de naranja contiene alrededor de 40% de fibra dietética, de la cual, la mitad corresponde a fibra dietética soluble. Al evaluar estos sustratos en el modelo de colon se obtuvo una disminución en la concentración de enterobacterias y un aumento en lactobacilos y bifidobacterias. Con los almidones se obtuvo una mayor concentración de AGCC y se estimuló la producción de ácido butírico, mientras que con la fibra de naranja y pectina sólo se obtuvo formación de ácido acético. Con el modelo de colon se contribuirá a aumentar el conocimiento sobre la ecología colónica, así como el efecto de diversas sustancias en su crecimiento y metabolismo.

ABSTRACT

The human proximal colon is the region of the large intestine where the greater prebiotic effect has been reported. However, this is not a region easily accessible to routine studies. In order to carry out studies on microbial ecology in this region, laboratory models that imitate some characteristics of the digestive system have been developed. The aim of this research was to build up a laboratory model with the same conditions of fermentation and adsorption than the human proximal colon, as well as to determine the response to the addition of inulin, resistant banana starch and orange dietary fiber. The model was constructed using a glass tube (50 x 5 cm) with a dialysis membrane inside. The substrate was introduced in the dialysis membrane three times a day, simulating a typical human food. The composition of the substrate was 58% carbohydrates, 35% protein, 3% fiber, 3% starch, 1% lipids in dry weight basis with 90% moisture. As inoculum it was used fecal cultivated biomass propagated in trypticasein soy broth (TSB). The intestinal absorption was simulated by means of a continuous flow of a solution of polyethylene glycol (PEG) outside the dialysis membrane. Grow of biomass to be used as fecal inoculum was achieved. The inoculum obtained had a concentration of microorganisms and short-chain fatty acids (SCFA) similar to that found in a fecal solution. The use of a propagated inoculum improves conditions for handling and transportation, increases concentration of anaerobic microorganisms, and avoid interference of unknown substances. In the proximal human colon model the growth of both aerobic and anaerobic microorganisms was obtained, as well as the production of short-chain fatty acids, similarly to those concentrations reported by other authors for this region. All microorganisms increased their count after inoculation of the substrate, and higher growths were obtained after each feeding. The concentration of SCFA inside and outside the membrane was significantly different due to the extraction efficiency of the PEG solution. The highest production was reached at 48 hours. At the beginning acetate was the predominant compound, but after 12 hours the proportion of butyrate increased while acetate decreased. This production of SCFA was similar to that of proximal colon in living systems. The continuous operation of the colon model for 48 hours was enough to obtain a good development of microorganisms and of SCFA production. This model reproduced the conditions of the human proximal colon adequately and can be used to study the development of the colonic microbiota. The addition of inulin in the model led to an increase in the concentration of total and facultative anaerobes, as well as lactobacilli and

bifidobacteria. On the other hand, in spite that the aerobic mesophilic count was increased, the concentration of coliforms and enterobacteria decreased. The concentration of clostridia remained the same at 24 hours until 48 hours; its growth was not affected by the addition of inulin. It was demonstrated the susceptibility of the colon model system to small changes in the metabolism of colonic microflora due to food stimulus such as the addition of inulin. The physicochemical and functional characterization o resistant starch of banana and orange dietary fiber was obtained. The starch from banana *Musa balbisiana* Colla contains more than a half of digestion resistant starch. Orange flour contains about 40% of dietary fiber, from which, a half is soluble dietary fiber. When these substrates were assessed in the colon model, a decrease in the concentration of enterobacteria was obtained, while an increase in lactobacilli and bifidobacteria resulted. With starch a grater concentration of SCFA was obtained and the production of butyric acid was stimulated, while with orange fiber and pectin only the formation of acetic acid was got. With this model it is possible to contribute to the knowledge of the ecology of colonic microbiota, as well as the effect of different substances in its growth and metabolism.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Sistema digestivo humano	4
3.2. Colon proximal	4
3.2.1. Contenido alimenticio	6
3.2.1.1. Carbohidratos	7
3.2.1.1. Proteínas	11
3.2.2. Microorganismos	12
3.2.3. Metabolismo	15
3.3. Modelos de laboratorio	19
3.4. Prebióticos	23
3.5. Plátano	30
3.6. Residuos cítricos	32
4. METODOLOGÍA	34
4.1. Sistema modelo	34
4.1.1. Estructura	34
4.1.2. Inóculo	35
4.1.3. Absorción	36
4.1.4. Condiciones de fermentación	36
4.1.5. Alimentación	36
4.2. Almidón de plátano	37
4.2.1. Almidón resistente tipo II de plátano	38
4.2.2. Almidón resistente tipo III de plátano	38
4.3. Fibra de naranja	38
4.3.1. Harina de fibra de naranja	38
4.3.2. Pectina	38

4.4. Evaluación de almidón y fibra en el modelo	39
4.5. Técnicas analíticas	39
4.5.1. Análisis fisicoquímicos	39
4.5.2. Recuento microbiano	40
4.5.3. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta	40
4.6. Análisis estadístico	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. Inóculo fecal	42
5.2. Sistema modelo	47
5.2.1. Sistema de absorción	47
5.2.2. Condiciones del modelo	49
5.2.3. Formulación del alimento	49
5.2.4. Frecuencia de alimentación	51
5.2.5. Producción de ácidos grasos de cadena corta	55
5.3. Respuesta del modelo a la adición de inulina	58
5.4. Evaluación en el modelo de almidón resistente y fibra como prebióticos	59
5.4.1. Almidón resistente de plátano	59
5.4.2. Fibra dietética de naranja	64
6. CONCLUSIONES	68
7. REFERENCIAS	69
8. PUBLICACIÓN	86

1. INTRODUCCIÓN

La flora intestinal del ser humano guarda una estrecha relación con su salud. Más del 95% de su población bacteriana vive en el tracto digestivo, principalmente en el colon. La función principal de la flora colónica es la fermentación de sustratos no digeridos en el intestino delgado, así como del moco producido por el epitelio intestinal (Guarner, 2002). El balance microbiano en este sitio determina las sustancias que pueden ser convertidas en compuestos benéficos o no para el huésped (Percival, 1997). Entre las sustancias que promueven el balance microbiano se encuentran los prebióticos, definidos como sustancias indigeribles que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas en el colon, principalmente lactobacilos y bifidobacterias (Roberfroid, 2000).

El colon es la región donde se ha reportado el mayor efecto prebiótico, sin embargo, no es un sitio fácilmente accesible para estudios de rutina (Macfarlane *et al.*, 1998). Por otra parte, el empleo de animales conlleva implicaciones tales como el aspecto ético, la evaluación continua de algunos parámetros y el costo (Van der Wert y Venema, 2001). Para estudios de ecología microbiana en esta región se han desarrollado modelos de laboratorio, entre los que se encuentra el SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbiology Ecosystem), diseñado por De Boever *et al.* (2000), en el que se reproduce el estómago, intestino delgado y colon ascendente, transversal y descendente en vasos de vidrio. Macfarlane *et al.* (1998) validaron un sistema de cultivo continuo con las tres regiones del colon humano representadas por tres contenedores de vidrio cerrados. Brück *et al.* (2003) propusieron el uso de solamente dos regiones del intestino grueso (proximal y distal), debido a que el colon transversal solamente constituye una vía de paso entre el ascendente y descendente. Sin embargo, estos modelos que imitan regiones del sistema digestivo representan las diferentes regiones intestinales a través de contenedores cerrados. En ellos se lleva a cabo una fermentación de flujo continuo sin tomar en cuenta el efecto de la absorción, lo que lleva a sobreestimar los metabolitos obtenidos. Además, debido a las condiciones alimenticias que se presentan en la región proximal del intestino grueso, se ha encontrado que el principal crecimiento de microorganismos ocurre en el colon proximal, siendo la segunda parte, principalmente de absorción de líquidos (Cummings, 1997). La investigación en nutrición humana requiere de modelos de laboratorio con altos valores

predictivos debido a que, simplemente, no es posible realizar estudios en voluntarios humanos de una gran variedad de nuevos productos o ingredientes para evaluar sus efectos fisiológicos.

Entre los prebióticos más estudiados se encuentra la inulina y la oligofructosa (Kaur y Gupta, 2002; Langlands *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a la importancia de los prebióticos en la regulación de la microflora intestinal se ha generado un gran interés en el desarrollo y evaluación de nuevas sustancias (Rycroft *et al.*, 2001). Entre las sustancias indigeribles que llegan al colon se encuentra el almidón resistente (Croghan, 2002) y la fibra dietética (Escudero y González, 2006), las cuales son prebióticos potenciales (García *et al.*, 2008), sin embargo, sus efectos en la microflora colónica aún no han sido suficientemente evaluados.

El objetivo de este trabajo fue construir un modelo de laboratorio que simule las condiciones de fermentación y absorción del colon proximal humano, determinar la respuesta a la adición de inulina como prebiótico conocido y evaluar el efecto de almidón resistente de plátano y fibra dietética de naranja en algunos grupos bacterianos de la microflora colónica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Construir un modelo con las condiciones de fermentación y absorción del colon proximal humano para la evaluación de prebióticos.

2.2. Objetivos específicos

- a) Obtener mediante cultivo un ecosistema bacteriano con la composición y concentración de algunos grupos microbianos fecales.
- b) Construir un sistema modelo que simule las condiciones de fermentación y absorción del colon proximal humano.
- c) Evaluar la respuesta bacteriana en el sistema modelo a una alimentación simulada.
- d) Evaluar la respuesta bacteriana en el sistema modelo a la adición de inulina como prebiótico de referencia.
- e) Caracterizar fisicoquímicamente el almidón de plátano y la fibra de naranja.
- f) Evaluar el efecto prebiótico del almidón resistente de plátano y la fibra dietética de naranja en el modelo.

3. ANTECEDENTES

3.1. Sistema digestivo humano

El sistema digestivo abarca el conjunto de órganos relacionados directamente con el proceso de digestión y absorción de nutrientes. Este sistema presenta partes claramente diferenciadas como son: la boca, el esófago, el estómago, la vesícula biliar y el páncreas, el intestino delgado y el intestino grueso. En el intestino delgado se lleva a cabo el proceso de digestión y absorción de nutrientes (Fuentes *et al.*, 1999) mientras que en el intestino grueso se realiza la fermentación de productos no digeridos en el intestino delgado (Cummings, 1997).

El intestino grueso es un órgano continuo que anatómicamente presenta diferencias regionales las cuales han sido denominadas como ciego, apéndice, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide, recto y canal anal (Abreu, 1981; Riverón, 1999). Sin embargo, fisiológicamente se ha clasificado en colon derecho o proximal y colon izquierdo o distal, con una región intermedia representada por el colon transverso (Haubrich, 1982; Christensen, 1985). En la Figura 1 se observan las diferentes regiones del intestino grueso.

3.2. Colon proximal

El colon derecho o proximal está constituido por el ciego y colon ascendente (Haubrich, 1982; Christensen, 1985). El ciego es la región donde desemboca el intestino delgado a través de la unión ileocecal; presenta forma de saco y suele ser más ancho (8.5 cm) que largo (6.5 cm). El colon ascendente se encuentra entre el ciego y el colon transverso y posee una longitud de 20 cm (Haubrich, 1982). El colon transverso posee una longitud de 40 a 50 cm y es el que posee mayor movilidad de todo el colon (Abreu, 1981).

En cuanto al tiempo de tránsito del bolo alimenticio y fecal, de la boca al ano toma cerca de 60 h en promedio en humanos adultos, y de este tiempo, de la boca al ciego es alrededor de 4-6 h, por lo que el tiempo de residencia en el colon es de alrededor de 54 h. En la región del ciego y colon derecho se han reportado un tiempo de 7 a 24 h, para el colon izquierdo entre 9 y 30 h, y para el recto y colon sigmoides entre 12 y 44 h (Cummings, 1997).

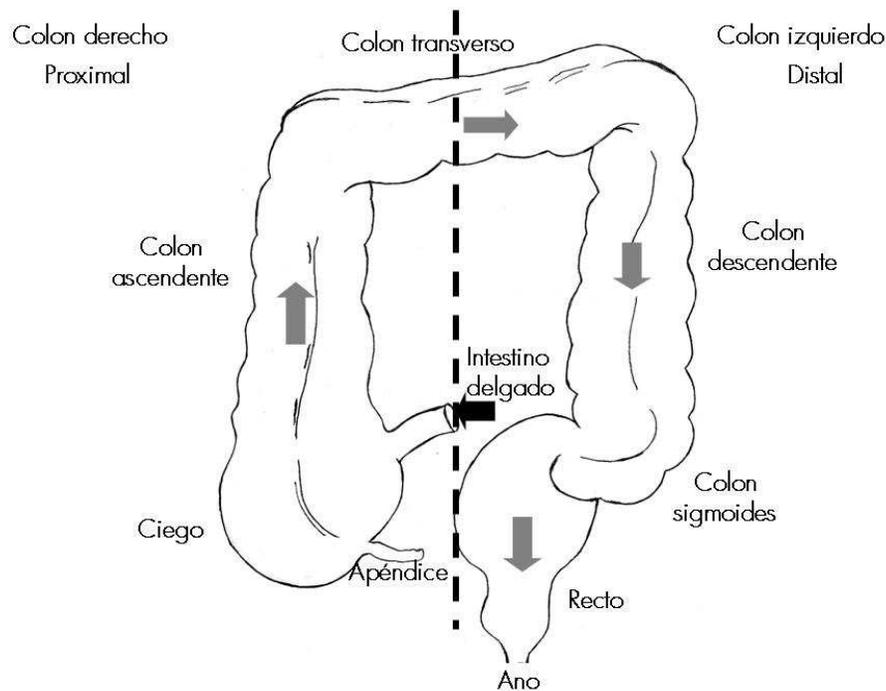


Figura 1. Anatomía del intestino grueso.

La propulsión en el colon se debe primordialmente a dos tipos de movimiento, el movimiento en masa, el cual tiene la función de mover el contenido a lo largo del intestino, y las ondas de propagación de alta amplitud, relacionadas con el proceso de defecación; sin embargo, estos últimos sólo se realizan entre una y dos veces al día (Cook *et al.*, 2000). En el colon proximal se ha demostrado la existencia de movimientos antiperistálticos que favorecen la mezcla del contenido (Tresguerres, 1999). La motilidad en esta región presenta un patrón de ondas lentas con una frecuencia de 9-10 ciclos/min, manteniéndose hasta el colon sigmoide (Snape, 1988). Las contracciones australes necesitan de 8 a 15 h para desplazar el quimo desde la válvula ileocecal hasta el colon transverso, y a partir del comienzo del colon transverso y hasta el sigmoide la propulsión depende de los movimientos de masa (Guyton y Hall, 2001).

Las funciones fisiológicas del colon mantienen un ambiente favorable para los patrones de fermentación adecuados, como aportar el sustrato necesario para la fermentación, temperatura constante cercana a los 37°C, fuerza iónica (osmolaridad) óptima,

potencial negativo de oxidorreducción (-250 hasta -450 mV), retirar el desecho no digerible (material sólido), mantener la tasa de eliminación de microorganismos compatible con los tiempos de regeneración celular y amortiguar o retirar los productos ácidos de la fermentación anaerobia, como son los ácidos grasos volátiles. La entrega de sustratos requiere sólo de la alimentación, otros como la temperatura y la fuerza iónica se obtienen por medio de los mismos mecanismos homeostáticos que mantienen estas condiciones fisiológicas dentro del cuerpo del huésped. El mantenimiento del potencial de oxidorreducción sólo requiere que existan condiciones anaerobias (Herdt, 1981).

3.2.1. Contenido alimenticio. El Cuadro 1 muestra el contenido del quimo que ingresa al colon proximal, el cual está constituido por carbohidratos, proteínas, moco y restos celulares y bacterianos.

Cuadro 1. Sustratos disponibles para la fermentación en el colon humano.

Tipo	Contenido	Cantidad (g/día)
Carbohidratos	Almidón resistente	5-35
	Polisacáridos no amiláceos	10-25
	Oligosacáridos	2-8
	Azúcares	2-5
	Carbohidratos sintéticos	Desconocido
Proteínas	De la dieta (N x 6.25)	1-12
	Endógena	4-8
	Urea, nitrato	0.5
Otros	Moco	3-5
	Reciclado bacteriano	Desconocido
	Células epiteliales	Desconocido
	Ácidos orgánicos	Desconocido
Total	Carbohidratos	20-60
	Proteínas	5-20

Fuente: Cummings, 1997.

El contenido del colon proximal en la región del ciego es una masa semilíquida, grumosa, de color amarillo claro y de olor agrio (Abreu, 1981; (Cummings, 1997)); sin embargo, en el colon descendente y sigmoidees del colon distal, el contenido intestinal posee la consistencia características de las heces (Escuredo *et al.*, 1995). Se ha reportado que el contenido de humedad va desde 85% en el ciego, hasta 77% en la región del colon

sigmoides (Cummings, 1997) y el valor de pH del contenido colónico va de 5.5 a 5.8 en la región del ciego, hasta 6.5 en el sigmoides (Cummings, 1997; Metges, 2000).

3.2.1.1. Carbohidratos. En promedio, la flora del colon es capaz de fermentar entre 60 y 80 g/día de carbohidratos (Cummings, 1997; Rustgi *et al.*, 2005). En el Cuadro 2 se muestra una clasificación de los carbohidratos del quimo colónico: de 2 a 10 g/día corresponden a azúcares no absorbibles, de 2 a 6 g/día a oligosacáridos, de 15 a 30 g/día a fibra dietética, y entre 15 y 20 g/día a almidón resistente (Cummings, 1997; Blasco y Soriano, 2006).

Cuadro 2. Clasificación de los carbohidratos de la dieta.

Grupo	Subgrupo	Digestión en el intestino delgado
Azúcares	Monosacáridos	Glucosa, fructosa, galactosa, sorbitol, manitol
	Disacáridos	Sacarosa, lactosa, maltosa
Oligosacáridos	α -glucanos	La mayoría de los productos de la hidrólisis del almidón
	No α -glucanos	Fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, rafinosa, estaquiosa, polidextrosa (em parte)
Polisacáridos	Almidón (α -glucanos)	Algunas formas de almidón resistente llegan al ciego
	Polisacáridos no amiláceos (no α -glucanos)	Pared celular: celulosa, hemicelulosa, pectina, etc.
		Almacenamiento: guar, inulina.
	Gomas, exudados, mucílagos: ispagula, estercúlia, karaya	Todas llegan al ciego

Fuente: Cummings, 1997.

a) Azúcares. El colon es un ambiente pobre en monosacáridos, ya que los oligosacáridos y polisacáridos son las principales fuentes de carbono (Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha reportado que algunos monosacáridos como la fructosa (Szilagyi *et al.*, 2007) y la glucosa (He *et al.*, 2007) y disacáridos como la lactosa (Salas-Salvadó, 2000; Casellas y Malagelada, 2003) pueden llegar al colon. En estudios realizados por Szilagyi *et al.* (2007) en voluntarios sanos españoles se ha encontrado que entre el 32.2% y 36.0% de la fructosa ingerida escapa a la absorción en el intestino delgado. Por otra parte, Mishkin *et al.* (1997) en pacientes con dispepsia funcional encontraron que la fructosa que escapa a la absorción está ligada a azúcares no absorbibles como el sorbitol. En cuanto a la glucosa, se ha reportado que en concentraciones de 0 a 200 mg/l mejora la apoptosis en el colon; sin embargo, al aumentar la concentración, no posee influencia significativa en la apoptosis y en la proliferación celular (He *et al.*, 2007). Por otra parte, la presencia de lactosa en el colon se debe a una mala absorción de este disacárido en niños mayores y adultos; en países del norte de Europa la prevalencia se encuentra entre 0 y 10%, mientras que en la población negra, israelí, mexicana e indio-americana, los valores son superiores al 90% (Salas-Salvadó, 2000).

b) Azúcares no absorbibles. Otros de los componentes de la dieta que pueden llegar al colon son los azúcares no absorbibles o sustitutos de azúcares. Entre estos azúcares se encuentran los oligosacáridos, disacáridos y azúcares alcoholes (Bornet, 1994; Oku y Sudako, 2002). Una alta ingestión de estos azúcares puede causar diarrea en humanos y animales; sin embargo, los efectos desaparecen cuando los azúcares son metabolizados por las bacterias intestinales. El Cuadro 3 muestra los principales sustitutos de azúcares.

Cuadro 3. Clasificación de algunos sustitutos de azúcares.

Sustitutos de azúcares	Ejemplos
Oligosacáridos	Galactosil-sacarosa, teandosa, 4-galactooligosacárido, 6-galactooligosacárido, xilooligosacáridos, fructooligosacáridos, isomaltooligosacáridos, gentiooligosacáridos, soyaoligosacáridos.
Disacáridos	Trehalosa, celobiosa, lactulosa, palatinosa.
Azúcares alcoholes	Eritritol, xilitol, sorbitol, malitol, lactitol, palatinit.

Fuente: Oku y Sudako, 2002.

c) Almidón resistente. Además de los azúcares, parte del almidón contenido en algunos alimentos también puede escapar de la digestión y absorción en el intestino delgado; este almidón es conocido como almidón resistente (AR) (Langkilde *et al.*, 2002; Vargas-Torres *et al.*, 2006) El almidón resistente se define como la suma del almidón y los productos de la degradación de almidón no absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Meyer y Tunland, 2001; Croghan, 2002), ha adquirido gran importancia respecto a la reducción en el consumo de calorías, estimulación de la microflora intestinal benéfica y prevención de algunas enfermedades cardiovasculares (Liljeberg *et al.*, 1996; Osterag, 1996).

El almidón resistente se encuentra presente en la dieta diaria, en la que se estima un consumo promedio de 3-20 g por cada 200 g de almidón total; sin embargo, esta cifra varía de acuerdo con las prácticas y costumbres alimenticias. La presencia del almidón resistente en sistemas alimenticios ocurre de manera natural con el consumo de frutas y semillas de leguminosas y, a menudo, se encuentra en alimentos con alto contenido de almidón como es el caso de cereales comerciales y productos de panadería, como resultado de la modificación o transformación térmica al que han sido sometidos. De igual manera, aunque en proporciones menores, se halla en alimentos comerciales que han sufrido modificación química en la estructura del almidón (Englyst *et al.*, 1992; Eliasson y Gudmundson, 1996). En alimentos procesados como pan y papa y en algunos alimentos como trigo, papas y guisantes hasta un 10-20% del almidón es considerado almidón resistente (Vázquez *et al.*, 2005).

Un aspecto interesante del almidón resistente ha sido su capacidad para proporcionar sustrato para la microflora colónica y promover la síntesis de ácidos grasos de cadena corta, especialmente butirato, reconocido como una importante fuente de energía para los colonocitos. Jenkins *et al.* (1998) utilizando 24 sujetos sanos, evaluaron el efecto de almidón resistente de maíz incluido en un producto cocido sobre la función colónica, el control glicémico y el metabolismo de lípidos del suero. En este estudio se observó un aumento en la concentración de butirato con relación a la dieta control.

En otro estudio realizado por Croghan (2002), 11 sujetos humanos fueron alimentados con una dieta alta (49 g/d) y baja (5 g/d) de almidón resistente durante cuatro semanas; las dietas estuvieron compuestas por semillas de trigo no procesadas, almidón de

maíz de alta amilosa y harina de plátano verde. Este estudio mostró que la dieta con alta cantidad de almidón resistente incrementó el volumen fecal, disminuyó el pH fecal e incrementó la excreción diaria de butirato.

d) Fibra dietética. Se conoce como fibra dietética a la parte comestible de partes de plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la absorción en el intestino delgado humano con una fermentación completa o parcial en el intestino grueso (Proxy, 2001). Las sustancias que forman la fibra son muy distintas entre sí por su estructura y sus propiedades; por lo que se clasifican unas como solubles (pectina, gomas, mucílagos, algunas hemicelulosas) y otras como insolubles (lignina, celulosa, la mayoría de las hemicelulosas) (García, 1990). El Cuadro 4 muestra los constituyentes de la fibra dietética.

Cuadro 4. Constituyentes de la fibra dietética.

Constituyentes	Ejemplos
Polisacáridos estructurales	Celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas y almidón resistente.
Polisacáridos no estructurales	Gomas y mucílagos.
Oligosacáridos	Inulina y fructooligosacáridos.
Compuestos no carbohidratos	Lignina, cutina, taninos, suberina, ceras, fitatos y saponinas.

Fuente: Valenzuela y Maiz, 2006.

En general, el consumo de fibra en la dieta occidental es de 15 a 20 g/día, muy por debajo de la recomendación de la Asociación Americana de Dietética; para adultos, la recomendación es de 20 a 35 g/día. Se recomienda que esta cantidad se alcance mediante el consumo de alimentos naturales que aportan una variedad de tipos de fibra, como también minerales y vitaminas (Valenzuela y Maiz, 2006).

El papel de la fibra dietética en la nutrición y la salud ha sido bien establecido ya que promueve efectos fisiológicos benéficos, tales como laxante y disminución del colesterol y glucosa en la sangre (Proxy, 2001) así como su influencia sobre el peso corporal, el riesgo de diabetes tipo II, y de enfermedad cardiovascular (Trallero, 2002). La fibra se ha relacionado con numerosas enfermedades y procesos que afectan al tubo digestivo, así, la

fibra no solo guarda relación con los mecanismos de tránsito intestinal de los alimentos, sino con toda una serie de procesos fisiológicos, como la diarrea, donde lo recomendable es administrar suero oral adicionado con fibra soluble o viscosa, ya que ayuda a controlar el número de deposiciones. En colitis ulcerosa, la acción que la fibra soluble ejerce sobre el metabolismo intestinal tiene su mejor ejemplo en la acción que realiza como protector y reparador de la mucosa intestinal. Tras su fermentación correspondiente y la producción de ácidos grasos de cadena corta, en especial butirato, facilita el incremento en el flujo sanguíneo local, estimula la proliferación de las criptas, mejora la proliferación de los colonocitos y ayuda a la regeneración de la mucosa actuando directamente como antiinflamatorio (Rubio, 2002). Se puede decir que cada tipo de fibra tiene propiedades diferentes en función de su solubilidad en agua, viscosidad, capacidad de ser fermentada o la posibilidad de inducir efectos a nivel sistémico (Gómez *et al.*, 2002).

El conocimiento de los efectos benéficos de dietas altas en fibra dietética hacia la prevención de enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer, así como en la inclusión de suplementos de fibra dietética en dietas adelgazantes, ha llevado al desarrollo de un mercado grande y productivo de productos ricos en fibra (Ling, 1995).

5.2.1.2. Proteínas. Además de los carbohidratos, existe cierta cantidad de proteínas que escapan a la digestión en el intestino delgado y que representan entre 5 y 12 g/día (Cummings, 1997). En un estudio realizado por Evenepoel *et al.* (1999), empleando proteínas marcadas con isótopos se estimó la cantidad y el destino de las proteínas de la dieta que escapan a la digestión. El estudio se realizó en diez voluntarios sanos y se encontró que en alimentos cocidos el 5.73% de la proteína escapa de la digestión, mientras que en alimentos crudos, escapa el 35.10%. Con esto se confirma que cantidades importantes de proteínas de fácil digestión pueden escapar de la asimilación en sujetos sanos (Evenepoel *et al.*, 1999).

Por último, un componente que no forma parte de la dieta, pero que se encuentra en el contenido colónico es el moco intestinal que representa entre 2 y 3 g/día del total de sustratos fermentables (Cummings, 1997; García *et al.*, 2002; Guarner y Malagelada, 2003). Es un complejo hidratado que está formado principalmente por glicoproteínas, y se

encuentra formando una capa sobre la superficie epitelial del tracto gastrointestinal (Bollard *et al.*, 2005).

3.2.2. Microorganismos. Además de los residuos de alimentos, el principal componente del contenido colónico son las bacterias, cuyo número excede 10^{11} por gramo. Se estima que cada individuo alberga unos 100 mil millones de bacterias de unas 400 especies distintas. En conjunto esta población viva del colon puede alcanzar hasta 400 o 500 gramos (Cummings, 1997; Guarner, 2002).

El intestino es estéril al nacimiento y la microflora se adquiere al momento del parto y en los días subsiguientes. La colonización inicial genera un microambiente anaeróbico que permite el crecimiento de anaerobios estrictos. La diferencia de gérmenes posteriores depende de diversos factores, siendo la dieta uno de los más importantes. En recién nacidos alimentados en forma exclusiva con leche materna, las bacterias predominantes son las bifidobacterias, con 1% de enterobacterias; en niños alimentados con fórmulas artificiales, la flora es compleja, e incluye bifidobacterias, *Clostridium*, *Streptococcus* y *Bacteroides*. Las especies bacteriana facultativas predominantes en la materia fecal de prematuros en cuidado intensivo son *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus coagulasa* negativo, enterobacterias y enterococos. El *Clostridium* es el anaerobio más frecuente y *Candida* el hongo más encontrado (Forero-Gómez y Vera-Cala, 2005). El desarrollo de una microflora intestinal equilibrada es de primordial importancia ya que determina parcial, aunque significativamente, el bienestar general y la salud del hospedero. La interacción entre la microflora y el hospedero es determinante en la regulación y modulación del sistema inmunológico desde los primeros días de la vida (Montijo *et al.*, 2008).

En adultos, la composición de la flora bacteriana es muy variable de un individuo a otro, pero muy estable dentro de cada individuo. La función principal de la flora del colon es la fermentación de los sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio intestinal. Con ello se recupera energía metabólica en forma de sustratos absorbibles, y además se promueve el crecimiento y proliferación de las propias bacterias. Por otra parte, previene la invasión de microorganismos patógenos por el llamado efecto barrera (Guarner, 2002). Esta microflora es capaz de interactuar con los sustratos (alimentos) y producir efectos benéficos al hospedero (Cagigas y Blanco, 2002).

En el intestino grueso existe un amplio número de bacterias con diferentes características nutricionales, lo que indica que existe una gran variedad de sustratos disponibles para su crecimiento. De acuerdo al tipo de sustrato, existen especies sacarolíticas, las cuales pueden metabolizar y fermentar carbohidratos complejos; también se encuentran bacterias que degradan proteínas, péptidos y aminoácidos, así como bacterias metanogénicas y otras que pueden crecer con la fermentación de productos intermedios, como hidrógeno, lactato, succinato y etanol. Hasta hoy se conoce que las especies predominantes numéricamente son las anaerobias no formadoras de esporas, entre las que se encuentran bacterias del género *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Bifidobacterium*. Además de las anteriores, algunas otras bacterias también se encuentran en un alto número, entre ellas se encuentran los lactobacilos, cocos Gram positivos anaerobios y clostridios. También se encuentran los anaerobios facultativos, como enterobacterias, pero típicamente, estas bacterias se encuentran en números de 2 a 3 órdenes de magnitud por debajo de los anaerobios estrictos (Cummings y MacFarlane, 1991). El Cuadro 5 muestra los principales grupos bacterianos presentes en el colon, así como sus productos de la fermentación.

Cuadro 5. Bacterias anaerobias predominantes en el colon y sus productos de fermentación.

Bacterias	Concentración Log10/g de materia seca	Ace	Pro	But	Lac	Suc
Bacteroides	11 ³	+	+	-	-	+
Eubacterias	10 ⁷	+	-	+	+	-
Bifidobacterias	10 ²	+	-	-	+	-
Lactobacilos	9 ⁶	-	-	-	+	-
Ruminococos	10 ²	+	-	-	-	-
Peptococos	10 ⁰	+	-	+	+	-
Peptoestreptococos	10 ¹	+	-	-	+	-
Clostridios	9 ⁸	+	+	+	+	-

Fuente: Cummings y MacFarlane, 1991; Ace = acetato, Pro = propionato, But = butirato, Lac = lactato, Suc = succinato.

Además, en la microflora del colon, se distingue entre la microflora del colon derecho denominada de fermentación y la del colon izquierdo o de putrefacción. El tubo digestivo contiene aproximadamente 10^7 bacterias que se renuevan dos o tres veces por día y que es distinta en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal. En el colon la microflora se modifica aún más y el número de bacterias -casi todas anaerobias- pasa de 10^{10} UFC/g de heces en el ciego hasta 10^{12} UFC/g de heces en el recto y sigmoides. Los anaerobios no esporulados representan 99% de la microflora, constituida por bacteroides (*fragilis*), bifidobacterias, clostridios, *Veillonella*, fusobacterias y algunos aerobios (estreptococos, enterobacterias, estafilococos) levaduras y protozoarios (Montijo *et al.*, 2008).

Marteau *et al.* (2001) reportan que la flora cecal humana difiere cuantitativa y cualitativamente de la flora fecal; contiene 100 veces menos anaerobios, mientras que los anaerobios facultativos representan una parte importante. Utilizando métodos tradicionales de cultivo encontraron que los valores de anaerobios totales, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* se encuentran por debajo de los encontrados en las heces fecales, sin embargo, en los anaerobios facultativos no se encontró diferencia, como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Algunos grupos de microorganismos presentes en el ciego y fecales humanos.

Microorganismos	Ciego (Log ₁₀ UFC/ml)	Fecales (Log ₁₀ UFC/ml)
Anaerobios totales	8.2 ± 0.22	10.4 ± 0.12
Anaerobios facultativos	7.4 ± 0.23	7.8 ± 0.29
<i>Bifidobacterium</i>	6.7 ± 0.45	8.9 ± 0.22
<i>Bacteroides</i>	7.4 ± 0.33	8.9 ± 0.42

Fuente: Marteau *et al.*, 2001.

En este mismo estudio Marteau *et al.* (2001), empleando secuencias específicas de rRNA 16S, encontraron que *E. coli* y *Lactobacillus*, ambos anaerobios facultativos, son los microorganismos predominantes en la región del ciego, lo que concuerda con lo reportado por Metges (2000), quien menciona que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* son las especies que pueden encontrarse adheridas en el ileum terminal y ciego. Los anaerobios estrictos representados por *Bacteroides*, *Clostridium cocoides* y *Clostridium leptum* fueron significativamente más bajos en el ciego.

Algunos tipos de cocos y bacilos formadores de esporas son también habitantes del tracto intestinal, entre los que se encuentra el género *Clostridium*; *C. perfringens*, *C. bifermentans* y *C. tetani* son regularmente aislados, aunque en número relativamente bajo (Cummings, 1997).

La presencia de la microflora bacteriana en el intestino tiene un papel fundamental en la homeostasis de la mucosa colónica, mediante la interacción de los comensales con el huésped a través de receptores de reconocimiento de patrones de péptidos (PPR) entre los que están los receptores *toll-like* (TLR). Los TLR son una familia de receptores que juega un papel clave en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata, los ácidos grasos de cadena corta, participan, además, en la activación de los genes mucina 1 (MUC) de la familia de genes de mucina que codifican para fosfoproteínas de membrana que se anclan a la superficie apical de la célula como dominios. Su función es el reconocimiento de patógenos activando cascadas de señalización intracelular y la producción de proteínas de mucina. En la membrana apical del colonocito se encuentran los TLR que son activados por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), expresados por agentes infecciosos que median la producción de citocinas. Los TLR-4, uno de los casi 10 tipos de receptores que componen esta familia, reconocen los lipopolisacáridos bacterianos presentes en la mayoría de las bacterias Gram negativas que desencadenan una cascada de señalización activadora de genes intranucleares en la cual la proteína de respuesta primaria para diferenciación mieloide 88 (MyD88) puede intervenir o no hacerlo (Quiroga *et al.*, 2007).

3.2.3. Metabolismo. La flora bacteriana del colon produce enzimas capaces de digerir carbohidratos y proteínas que escapan del proceso de digestión común en el intestino delgado. Este proceso de digestión, como se produce en condiciones anaeróbicas, se le denomina fermentación (García *et al.*, 2002; Guarner, 2002).

Como resultado de la fermentación bacteriana colónica se producen gases, vitaminas y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (García *et al.*, 2002). La composición del gas presente en el intestino grueso comprende nitrógeno (64%), hidrógeno (19%), dióxido de carbono (19%), metano (3%) y oxígeno (1%) (Cummings, 1997). Las bacterias de la flora sintetizan varias vitaminas del grupo B y vitamina K, que se absorben en ciego y colon

derecho, y favorecen la recuperación y absorción de iones como el calcio, hierro y magnesio (Guarner, 2002). Desde el punto de vista del huésped, los productos de las reacciones de fermentación son importantes ya que son absorbidos e influyen en muchos aspectos del metabolismo, por lo que el control de la fermentación es de importancia crítica para el hombre (Cummings y Macfarlane, 1991)

El espectro de AGCC producido por la flora bacteriana depende tanto del tipo de bacterias y el sustrato disponible (Pácha, 2000). Entre los principales se encuentran el acético, el propiónico y el butírico, en una proporción molar casi constante 60:25:20 (García *et al.*, 2002). Estos ácidos grasos de cadena corta representan entre el 85 y el 95% del total de AGCC, el porcentaje restante corresponde a ácidos grasos de cadena ramificada, isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato, junto con otros compuestos orgánicos como lactato y succinato (Cummings y Macfarlane, 1991).

En infantes, la concentración y el tipo de ácido graso de cadena corta producido está relacionado con el tipo de alimentación. Se ha encontrado que en infantes alimentados con leche materna se produce principalmente ácido acético, mientras que en los alimentados con leche a base de fórmulas se produce ácido butírico y propiónico (Pácha, 2000).

En adultos, estos ácidos grasos son producidos a partir de carbohidratos, péptidos y glicoproteínas mediante fermentación en diferentes procesos metabólicos de las bacterias anaerobias. Sin embargo, el tipo de AGCC está determinado por el número y el tipo de microflora bacteriana presente en el colon, el sustrato disponible y el tiempo de tránsito en la luz del colon. El principal sitio de fermentación es el segmento proximal y el ciego debido a que los segmentos distales tienen menor concentración de agua y carbohidratos así como el pH se incrementa progresivamente hacia esos segmentos. Al realizar cuantificación de los AGCC en pacientes colostomizados, se ha observado una disminución progresiva de la concentración de los mismos hacia los segmentos distales (Quiroga *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos de cadena corta pueden alcanzar concentraciones de 100 mmol/kg de heces (Aalkjær, 2002). Sin embargo, se ha encontrado que la concentración es más alta en el colon derecho que en el izquierdo (Cummings, 1997), como se muestra en el Cuadro 7. *In vitro*, se ha encontrado que la producción endógena de AGCC es de ~250 mmol/kg/48 h durante la incubación con inóculo colónico proximal, disminuyendo a ~50 mmol/kg/48 h con

inóculo colónico distal, lo cual puede deberse a cambios en el tránsito o en el suministro de sustrato (Topping y Clifton, 2001).

Cuadro 7. Concentración de AGCC en colon derecho e izquierdo.

Ácidos grasos de cadena corta	Colon derecho (mmol/kg de quimo)	Colon izquierdo (mmol/kg de heces)
Acetato	109.0	62.0
Propionato	36.0	30.0
Isobutirato	0.8	1.4
Butirato	25.0	11.0
Isovalerato	0.6	1.2
Valerato	2.1	2.2
Caproato	1.4	1.8

Fuente: Cummings, 1997.

Los AGCC, en particular el butirato, regulan la absorción de líquidos y electrolitos, inducen la proliferación, el crecimiento y diferenciación celular en la mucosa del colon (Quiroga *et al.*, 2007). Diversos estudios han sugerido que el butirato puede actuar como un agente protector en el cáncer de colon, ya que se le reconoce como inductor del proceso de diferenciación celular y actúa como agente antiproliferativo al detener el crecimiento celular en la fase G1; también se asocia con la estimulación de la apoptosis. *In vivo*, el efecto de butirato sobre la proliferación es menos claro puesto que es un combustible primario para los colonocitos y el reemplazo de butirato puede resultar en una proliferación incrementada (Bingham, 2000).

Cerca del 95% de los AGCC producidos en el colon son absorbidos (Cummings, 1997). El grado en que estos ácidos grasos son absorbidos a través de la mucosa del intestino grueso se ha encontrado que es dependiente de la concentración (Fitch y Fleming, 1999). Los mecanismos de absorción de los ácidos grasos en el epitelio del colon no están completamente claros. La hipótesis actual propone dos mecanismos importantes para su absorción: la difusión de los AGCC en forma protonada con participación de las bombas Na/H⁺, H⁺/K⁺ ATPasa favorecida por la producción ácida de las bacterias al convertir más ácidos grasos de cadena corta en su forma protonada que es la forma en la cual pueden

difundir a la célula, y el intercambio aniónico mediante intercambiadores de aniones de la membrana apical del enterocito (Quiroga *et al.*, 2007).

La absorción de los ácidos grasos de cadena corta está relacionada con la absorción del cloruro de sodio (NaCl). La absorción de propionato, butirato y acetato se produce principalmente por difusión no iónica y absorción paracelular en el colon proximal. La absorción de AGCC no sólo sirve como suministro de energía para las células epiteliales del colon, sino que también es un factor importante que regula el equilibrio de fluidos del colon, la absorción de NaCl y el pH celular (Kunzelmann y Mall, 2002).

El butirato y los otros AGCC contribuyen en un 80% a los requerimientos energéticos del colonocito y en un 5-10% al total de los requerimientos energéticos del individuo. Una vez absorbidos son metabolizados por el epitelio colónico. Diversos estudios han demostrado que el orden de utilización de los AGCC por el colonocito es butirato > acetato > propionato. La mayoría del butirato (aproximadamente el 90%) y entre el 10 y el 50% del propionato es metabolizado por la mucosa colónica. El remanente del propionato y el acetato alcanzan el hígado. El propionato es utilizado como sustrato para la gluconeogénesis y el acetato es metabolizado, dando lugar a glutamina y cuerpos cetónicos, acetoacetato y hidroxibutirato. Estos alcanzan el intestino delgado, siendo los principales sustratos energéticos del enterocito, fundamentalmente, la glutamina. Sin embargo, el orden utilización de todos estos sustratos por el colonocito, según se ha demostrado en estudios *in vitro* es butirato > acetoacetato > glutamina > glucosa. El acetato es el AGCC que en mayor concentración se encuentra en sangre periférica. A nivel sistémico, los AGCC regulan el metabolismo lipídico y de la glucosa. En cuanto al metabolismo lipídico, se ha demostrado que el propiónico disminuye la síntesis hepática de colesterol, por inhibición de la actividad de la hidroximetilglutaril coenzima A. El acetato y el propionato regulan el metabolismo de la glucosa, en tanto que disminuyen la glucemia posprandial y la respuesta insulínica. (García *et al.*, 2002)

Los aminoácidos y péptidos son usados como fuentes de carbono, nitrógeno y energía por un amplio rango de bacterias en el intestino grueso humano. Las aminas son algunos de los productos del metabolismo bacteriano de los aminoácidos. Se ha encontrado que la concentración media en el colon proximal ha sido de 22 mmol/kg y en el colon distal,

la concentración fue de 16 mmol/kg. Sin embargo, se ha encontrado que la producción de estos compuestos potencialmente tóxicos producidos por las bacterias intestinales puede ser reducida al incrementar la cantidad de carbohidratos fermentables presentes en el colon como al almidón y la fibra dietética. Por lo que la reducción de los procesos de putrefacción puede disminuirse con medidas relativamente sencillas de manipulación de la dieta (Smith y Macfarlane, 1996). Por otra parte, en el colon, es difícil separar los productos formados ya que existen bacterias (como enterococos y enterobacterias) que pueden fermentar tanto aminoácidos como carbohidratos, mientras que otras son aminoácido fermentadores obligados (Smith y Macfarlane, 1997).

Además de las aminas y el amonio, se ha reportado que el metabolismo de los aminoácidos también produce ácidos grasos de cadena corta; sin embargo, los tipos de AGCC producidos dependen de la composición del sustrato. En estudios realizados por Smith y Macfarlane (1997) se analizó la producción de los ácidos acético, propiónico y butírico al fermentar 20 aminoácidos con bacterias fecales humanas y el tipo de ácido graso producido varió de un aminoácido a otro.

Las mucinas son glicoproteínas endógenas producidas por las células caliciformes del tracto gastrointestinal. Constituyen los principales componentes estructurales de la mucosa que actúa como barrera protectora contra antígenos lumbinales. Un número de bacterias intestinales son capaces de usar la mucina como fuente de carbono y energía. Estudios realizados por Willis *et al.* (1996) demostraron que el metabolismo de la mucina incrementó el número de bacterias reductoras de sulfato. En este estudio se encontró que al emplear mezcla de bacterias fecales se obtuvo una degradación eficiente de la mucina, mientras que con cultivos puros solamente se obtuvo una degradación parcial.

3.3. Modelos de laboratorio

Tiempo atrás se creía que el colon no tenía ningún papel desde el punto de la digestión y absorción de nutrientes. Hoy se sabe que es un órgano fundamental en el aprovechamiento de los nutrientes que escapan a la digestión. La flora bacteriana colónica produce enzimas capaces de digerir carbohidratos y proteínas, que escapan del proceso de digestión común en el intestino delgado (García *et al.*, 2002). La microflora colónica se ha relacionado con la etiología de ciertos desórdenes como colon irritable, gastroenteritis y

cáncer de colon (Steer *et al.*, 2000). La obtención de estos conocimientos ha sido posible debido al empleo de modelos animales (Valiente *et al.*, 1999; Montalto *et al.*, 2001) y al desarrollo de sistemas que imitan las condiciones fisiológicas del sistema digestivo humano.

Por otra parte, desde el descubrimiento de la propiedad probiótica de algunas bacterias, así como la actividad prebiótica de algunas sustancias alimenticias se ha despertado el interés por la búsqueda de metodologías que permitan obtener datos biológicamente significativos (Gibson *et al.*, 2004). Mucha de la información generada sobre el sistema digestivo y sus implicaciones en la salud proviene de modelos de laboratorio. Se ha encontrado que los modelos de laboratorio poseen ventajas sobre los modelos humanos y animales, ya que no es necesario considerar el aspecto ético, además, es posible la evaluación continua de algunos parámetros, y muchas veces a menor costo (Van der Wert y Venema, 2001). En el Cuadro 8 se muestra un resumen del desarrollo de algunos sistemas de laboratorio para el estudio de la actividad probiótica y prebiótica en el sistema digestivo.

Entre los sistemas más sencillos empleados en el estudio de la fermentación colónica se encuentran los de cultivo por lote; Wolin *et al.* (1999) mediante el uso de tubos de ensayo anaerobios obtuvieron la cantidad de AGCC producidos a partir de glucosa y sustrato colónico durante 24 h, con este método se obtuvo la producción de acetato (56.8%), propionato (20.0%) y butirato (23.2%). Mazur *et al.* (1993) evaluaron el efecto de carbohidratos no digeribles en la microflora colónica; Rossi *et al.* (2005) empleando este método, evaluaron la fermentación de fructooligosacáridos e inulina por bifidobacterias y microflora fecal.

Debido a la importancia de probióticos y prebióticos en algunas regiones del colon, se ha desarrollado modelos que imitan ciertas regiones del intestino grueso. Brück *et al.* (2003) propusieron el uso de solamente dos regiones del intestino grueso (proximal y distal) debido a que el colon transversal sólo es una vía de paso entre el ascendente y descendente. Con este modelo se evaluaron sustancias contenidas en la leche materna (glicomacropéptido y lactoalbúmina) que pueden promover el crecimiento de la microflora gastrointestinal benéfica (bifidobacterias) y ayudar a superar las infecciones entéricas. Con estos resultados se pudo explicar por qué los niños alimentados con lactancia experimentan menos infecciones intestinales que sus homólogos alimentados con fórmula.

Cuadro 8. Desarrollo de modelos de laboratorio para estudio de probióticos y prebióticos.

Modelos	Sustratos	Efecto
Pruebas en tubos; cultivos puros (varios)	Inulina, oligofruetosa, glucosa	El pH como primer indicador de la promoción selectiva de bifidobacterias.
Por lote; lavado fecal como inóculo	Glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, lactosa, sacarosa, celobiosa, lactulosa, oligofruetosa, inulina, almidón, pectina, arabinogalactanos, sorbitol, lactitol, maltitol, polidextrosa.	Se demostró el incremento selectivo de bifidobacteria. El monitoreo de la producción de AGCC reveló una alta producción de acetato (y lactato) con oligofruetosa.
Por lote; cultivos puros (<i>Bifidobacterium</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Bacteroides</i>)	Inulina, oligofruetosa, glucosa. oligofruetosa ramificada,	Grado de crecimiento de bifidobacterias en oligofruetosa > inulina > oligofruetosa ramificada > glucosa. Se observó crecimiento más rápido en glucosa de cepas diferentes de <i>Bifidobacterium</i> .
Por lote; difusión quimostática. Inóculo de cultivos puros.	Oligofruetosa	Demostración del efecto inhibitorio de <i>Bifidobacterium</i> sobre el crecimiento de otras bacterias colónicas como una posible explicación al aumento del efecto bifidogénico.
Tres estados quimostáticos; lavado fecal libre de metanógenos como inóculo.	Inulina	Incremento selectivo de <i>Bifidobacterium</i> . Disminución de <i>Clostridium</i> .
Por lote; cultivo puro de <i>Bifidobacterium</i> spp.	Xilo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, oligosacáridos de frijol de soya, inulina, pirodextrina, oligofruetosa.	Al determinar el máximo crecimiento específico (μ_{max}) reveló diferencia significativa interespecie sobre el sustrato de crecimiento.
Quimostático; población definida de quince cultivos puros representativos de las bacterias intestinales más abundantes	Una mezcla de inulina, pectina, xilanos, arabinogalactanos y almidón.	Validación del modelo seguido del estudio de interacciones bacterianas (por ejemplo, resistencia a la colonización)

Fuente: Van der Wert y Venema, 2001.

Macfarlane *et al.* (1998a) validaron un sistema de cultivo continuo que simula las condiciones del colon humano. En este modelo se representaron tres regiones del colon empleando contenedores de vidrio cerrados. Este modelo se ha utilizado en diferentes estudios, Macfarlane *et al.* (1999) evaluaron el efecto del tiempo de retención en la población bacteriana, el metabolismo de carbohidratos y la formación de ácidos grasos de cadena corta. Este estudio permitió conocer algunos sustratos preferenciales de las bacterias del colon, como los xilanos e inulina. En cuanto a los ácidos grasos de cadena corta, se encontró que la fermentación fue más eficiente a un menor tiempo de retención. Esto se debe probablemente a un aumento de las necesidades energéticas de mantenimiento a bajas tasas de crecimiento bacteriano. También se observaron diferencias con respecto a los ácidos grasos de cadena corta molares, con una producción mayor de propionato de cadena ramificada, lo que demuestra la creciente importancia de la fermentación de aminoácidos en estas condiciones de cultivo.

Empleando el modelo anterior compuesto por tres contenedores, Probert *et al.* (2004) evaluaron el efecto en la microflora colónica de tres sustratos fermentables: polidextrosa, lactitol y fructooligosacáridos. Con respecto a la estimulación de bifidobacterias y otras bacterias, el lactitol fue el sustrato menos prometedor. Sin embargo, como producto de su fermentación bacteriana se obtuvo principalmente ácido butírico, el cual posee efecto benéfico en la salud intestinal. Si las bacterias estimuladas por lactitol no poseen propiedades no deseadas, se puede tener un nuevo prebiótico no bifidogénico. Por el contrario, oligofruktosa y polidextrosa demostraron tener potencial prebiótico en todos los ensayos realizados al observarse un aumento significativo de bifidobacterias. En conclusión, este estudio confirmó las aseveraciones de varios estudios previamente realizados en estudios clínicos humanos.

Un modelo desarrollado por Rautonen *et al.*, (2005) para el colon propuso el empleo de cuatro regiones, las cuales fueron representadas por vasos cerrados. Este modelo se empleó para la evaluación de polidextrosa como prebiótico. En este estudio, se obtuvo una degradación progresiva de polidextrosa en cada etapa de la fermentación del colon. Paralelamente a su degradación, se incrementó la producción de AGCC. Este modelo permitió conocer el efecto prebiótico de esta sustancia.

También se han desarrollado modelos que imitan varios segmentos del tracto digestivo; uno de estos modelos es el SHIME, Simulator of the Human Intestinal Microbiology Ecosystem. En este sistema De Boever *et al.* (2000), reprodujeron el estómago, intestino delgado y colon ascendente, transversal y descendente en diferentes vasos de precipitado. Cada uno de los vasos representa una sección con características bien definidas en alimentación y condiciones de pH y temperatura. Este sistema es controlado manualmente.

Finalmente, se han desarrollado modelos controlados por computadora en la que las condiciones en el estómago, intestino delgado y el intestino grueso pueden ser simuladas en forma exacta y reproducible. Este mecanismo ofrece la oportunidad de comparar diferentes productos en idénticas condiciones. Estos modelos son instrumentos con los que posible estudiar la estabilidad, la digestibilidad, absorción y bioconversión de nutrientes, productos químicos y farmacéuticos en el tracto gastrointestinal. El modelo de simulación de la región proximal del intestino grueso (TIM-2) Recientemente se ha demostrado ser una herramienta valiosa en la investigación de los efectos del modo de acción de prebióticos, como la inulina. Este modelo ha sido desarrollado y validado con datos de personas con muerte súbita. En el modelo por el intestino grueso (TIM-2) las condiciones simuladas son: temperatura corporal, el pH del lumen, la llegada de un sustrato predigerido a partir del íleon, mezcla y transporte del contenido intestinal, la absorción de agua, y la presencia de un complejo de alta densidad metabólicamente activo y microbiota anaeróbica de origen humano. Para evitar la inhibición del crecimiento de la microbiota por la metabolitos producidas por microorganismos (principalmente AGCC y lactato), estos productos metabólicos son absorbidos por el sistema a través de una membrana semipermeable en el interior de la luz del modelo. De esta manera, una microbiota humana podría mantenerse estable en el TIM-2 durante un máximo de 3 semanas, sin cambios en la composición o actividad (Venema *et al.*, 2003).

3.4. Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que producen efectos benéficos al estimular selectivamente el crecimiento y la actividad de una o varias bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del huésped. Los prebióticos constituyen el sustrato fundamental de las bacterias probióticas (Cumings, 2001; Milo, 2002; Van Loo, 2004; Gibson *et al.*, 2004; Leal y Moreno, 2006; Roberfroid,

2007). La eficacia de los prebióticos está relacionada con la capacidad de resistir la digestión en el intestino delgado y alcanzar el intestino grueso, donde un restringido grupo de microorganismos los utiliza de un modo selectivo, principalmente bifidobacterias y lactobacilos (Roberfroid, 2001; García *et al.*, 2002; Oliveros y Moreno, 2006).

Para que un componente alimenticio se considere prebiótico debe cumplir con los criterios siguientes: no debe ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal; debe constituir un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias comensales benéficas del colon, estimulando su crecimiento y metabolismo; debe modificar la composición de la flora del colon, facilitando el desarrollo de especies benéficas y debe inducir efectos en la luz intestinal o sistémicos que sean beneficiosos para la salud del individuo que los consume (Goñi, 1999; Cummings *et al.*, 2001; Roberfroid, 2001; Gibson *et al.*, 2004; Pavón y Guillán, 2005; Oliveros y Moreno, 2006).

Los compuestos más importantes y mayor estudiados que cumplen con los criterios para ser considerados prebióticos son los fructanos, principalmente la inulina, los fructooligosacaridos (FOS), los galactooligosacáridos (GOS), la lactulosa, el lactitol y la lactosacarosa (Roberfroid, 2000; Rao, 2003; Tojo *et al.*, 2001; Playne *et al.*, 2003; Tojo *et al.*, 2003; Olano y Del Castillo, 2005; Oliveros y Moreno, 2006; García y Velasco, 2007). Incluida en este concepto está la fibra dietética y el almidón resistente (Cagigas y Blanco, 2002; García *et al.*, 2002; García y Velasco, 2007; Oliveira y González-Molero, 2007). Prácticamente todos los prebióticos son carbohidratos, aunque algunas proteínas como la lactoferrina (proteína de leche) ejercen efectos similares (Jiménez-Guzmán y García-Garibay, 2006).

La fermentación es una característica común de la microflora intestinal. En el colon ocurren fundamentalmente dos tipos de fermentación: sacarolítica y la proteolítica. La fermentación sacarolítica es la más beneficiosa para el organismo ya que produce principalmente los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), acético, propiónico y butírico. Estos ácidos grasos se generan en el metabolismo del piruvato, producidos por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof. En cambio, la fermentación proteolítica produce derivados nitrogenados como aminos, amonio y compuestos fenólicos,

algunos de los cuales son carcinogénicos (Guarner y Malagelada, 2003; García y Velasco, 2007).

Como producto final de la fermentación de los prebióticos por las bifidobacterias y lactobacilos se produce ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) (Roberfroid, 2000; Roberfroid y Slavin, 2000; Cummings *et al.*, 2001; Rao, 2001; Wolowski y Pool-Zobel, 2001; Cagigas y Blanco, 2002). Los ácidos láctico y succínico también pueden ser producidos pero de una manera más selectiva (Inagaki y Sakata, 2001). La acidificación del medio debida a la actividad fermentativa inhibe el desarrollo y la colonización de patógenos, así como la producción de elementos tóxicos derivados de su metabolismo (amonio, compuestos fenólicos, aminas, etc.) (Sanz *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2006; Blaut, 2002). Por otro lado, el ácido butírico constituye la principal fuente de energía para los colonocitos, estimulando la proliferación celular y regulando la apoptosis y la composición del *mucus*. De este modo, contribuyen globalmente a estabilizar la función barrera del intestino (Sanz *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2002).

En estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha reportado que los prebióticos son una fuente de ácidos grasos de cadena corta con importantes funciones a nivel local (intestinal) y sistémico (Cummings *et al.*, 2001; Roberfroid, 2001; Hooper *et al.*, 2002; Tungland y Meyer, 2002; Roberfroid, 2005; García y Velasco, 2007). Actualmente, se considera que los ácidos grasos de cadena corta pueden contribuir a la función barrera o protectora del epitelio intestinal y participar en el control de varios procesos como la proliferación mucosal, la inflamación, la carcinogénesis colorrectal, la absorción de minerales y la eliminación de compuestos nitrogenados (Jenkins y Kendall, 2000; Jie *et al.*, 2000; Karppinen, 2000; Olano-Martin *et al.*, 2000; Murphy, 2001; Williams y Jackson, 2002).

El aporte de prebióticos en la dieta se realiza por medio de alimentos naturales (ajo, cebolla, plátano, achicoria, alcachofa, espárrago) o incorporándolos a alimentos como productos lácteos, bebidas, pastelería y cereales (Roberfroid, 2000; Pavón y Guillán, 2005; Martínez-Costa, 2006). Entre los alimentos prebióticos también se incluye la fibra soluble (pectinas, gomas y mucílagos), cuyas fuentes dietéticas son la avena, legumbres, manzana y cítricos, entre otros (Tojo *et al.*, 2003; Gimeno, 2004; Martínez-Costa, 2006).

Los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina son los oligosacáridos con mayor evidencia de efecto prebiótico por su efecto estimulador sobre las bifidobacterias y, en menor grado, sobre los lactobacilos (Kolida *et al.*, 2002; Roberfroid, 2002; Roberfroid, 2005; García y Velasco, 2007). Son polímeros de fructosa que proceden habitualmente de la achicoria o que se obtienen por síntesis, con un grado de polimerización de 2 a 20 unidades en el caso de los FOS y de 2 a 60 unidades en el caso de la inulina. Ambos son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas y se fermentan completamente en el colon preferentemente por las bifidobacterias (Kolida *et al.*, 2002; Roberfroid y Gibson, 2002). Dado su potencial osmótico y excesiva fermentación algunos producen efectos adversos como flatulencia, meteorismo y diarrea (Ortuño, 2006; Molina y Martín, 2007).

La inulina estimula selectivamente el crecimiento de las bifidobacterias de la microflora colónica. Esto se ve demostrado con un aumento de bifidobacterias en la materia fecal (Roberfroid, 2000; Roberfroid, 2001; Sanz *et al.*, 2003). Estudios experimentales *in vitro* han demostrado que, en el caso de los fructooligosacáridos, son metabolizados selectivamente por las bifidobacterias, y que esta fermentación selectiva induce a una disminución del pH del medio, debido a la producción de grandes cantidades de lactato y acetato que inhiben el crecimiento de *E. Coli*, *Clostridium* y otras bacterias patógenas como *Listeria*, *Shigella* o *Salmonella*. La fermentación selectiva de la inulina y FOS por las bifidobacterias también se ha demostrado *in vivo* mediante pruebas con voluntarios (Kolida *et al.*, 2002; Roberfroid, 2005; Molina y Martín, 2007).

Los fructooligosacáridos se encuentran disponibles comercialmente en Japón, Estados Unidos, Europa y en México. Son producidos a partir de la hidrólisis parcial de inulina extraída de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) por acción de enzimas fúngicas en sacarosa para obtener un producto denominado Neosugar. Otro método de obtención es la síntesis a partir de sacarosa usando la enzima transfructosilasa (Escalante, 2001; Figueroa *et al.*, 2006).

El uso de inulina y oligofructosa en la alimentación tiene diversos enfoques: se destaca el enriquecimiento con fibra en productos de panadería y cereales para desayuno; retención de agua (pastelería, panificación, embutidos); sustitución de azúcar normal por fructosa en productos de repostería, reduciendo así su contenido calórico; mejoramiento y

modificación de la textura o cremosidad de algunos alimentos; sustitución de grasas en nata, helados, margarinas, mantequillas, productos cárnicos y horneados; enriquecimiento con fibra dietética en leche, yogurt, bebidas dietéticas y productos de soya; producción de bebidas lácteas funcionales (Figuroa *et al.*, 2006). La inulina comercial (Frutafit) ha sido empleada como un ingrediente alimenticio con aplicaciones como sustituto de grasas (Escalante, 2001; Figuroa *et al.*, 2006).

Además de la inulina y los FOS, en la actualidad se está estudiando el metabolismo y propiedades de otros oligosacáridos: los galactooligosacáridos (GOS). Los GOS son carbohidratos producidos por la acción de una enzima (beta-galactosidasa) sobre la lactosa. Estos carbohidratos tampoco sufren digestión luminal ni de membrana, pero son metabolizados casi en su totalidad en el colon, preferentemente por las bifidobacterias y los lactobacilos (Holma *et al.*, 2002; García y Velasco, 2007). Este tipo de compuestos están presentes en la leche materna y de vaca, e incluyen a oligosacáridos que contienen N-acetilglucosamina, productos de la hidrólisis enzimática de proteínas, glicoproteínas. Estos oligosacáridos transgalactosilados (TOS) han sido producidos comercialmente para ser incorporados en productos tales como el Oligomate 55® (Escalante, 2001; Figuroa *et al.*, 2006). Se ha demostrado que los oligosacáridos prebióticos son capaces de incrementar los recuentos de bifidobacterias intestinales, así como causar la reducción de ciertas bacterias patógenas (Kolida *et al.*, 2002; Aggett *et al.*, 2003; Soriano y Guarner, 2003; Furrie *et al.*, 2005; Pavón y Guillán, 2005).

En voluntarios sanos la suplementación de una dieta controlada con 15 g/día, de inulina o FOS durante 15 días, produce un incremento significativo de bifidobacterias en heces, mientras disminuye la producción de *Bacteroides*, *Clostridium* y *Fusobacterium*. Al ingerir inulina, la flora bacteriana no deseable se reduce significativamente, a la vez que aumenta la flora bifidobacteriana beneficiosa en la zona intestinal. Así, se estimula el metabolismo de las bifidobacterias y se aumenta su actividad (Escalante, 2001; García *et al.*, 2001).

Se ha realizado numerosos estudios clínicos tanto en adultos como en niños para analizar el efecto prebiótico de los FOS y GOS. Todos los estudios demostraron que los FOS y GOS son oligosacáridos prebióticos y tienen el potencial de incrementar la concentración

de bifidobacterias en el colon (Rigo *et al.*, 2001; Saavedra y Tschernia, 2002; Moro *et al.*, 2003; Boehm *et al.*, 2004).

La fibra dietética se define como los polisacáridos vegetales y la lignina, que resisten a la hidrólisis por las enzimas digestivas del ser humano. De acuerdo a su solubilidad en el agua, se clasifica en soluble e insoluble (Escudero y González, 2006; García y Velasco, 2007). Las fibras solubles son fácilmente fermentables, se encuentran fundamentalmente en frutas, legumbres y cereales como la cebada y la avena, la cebolla etc. Su solubilidad en agua condiciona la formación de geles viscosos en el intestino. Se caracterizan por ser rápidamente degradadas por la microflora anaerobia del colon. Este proceso de fermentación depende en gran medida del grado de solubilidad y del tamaño de sus partículas, de manera que las fibras más solubles y más pequeñas tienen mayor grado de fermentación. Este proceso da lugar, entre otros productos, a los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los efectos fisiológicos más importantes de los AGCC consisten en disminuir el pH intraluminal, estimular la reabsorción de agua y sodio, fundamentalmente en el colon ascendente, y potenciar la absorción en el colon de cationes divalentes. No obstante, el consumo habitual de una dieta con excesivo aporte de fibra no está exento de complicaciones (flatulencia, distensión gástrica, etc.) (García *et al.*, 2002; García y Velasco, 2007).

Otros prebióticos efectivos son los almidones resistentes (AR). Se definen como la suma del almidón y de los productos procedentes de la degradación del almidón que no son digeridos en el intestino delgado de los individuos sanos (García *et al.*, 2002; García y Velasco, 2007). Estudios hechos con ratas, cerdos y otros animales han demostrado que los almidones resistentes altos en amilosa incrementan el número de las bacterias benéficas y disminuyen el de las dañinas en el colon. Específicamente el tipo 2 (AR2) incrementa la concentración de bifidobacterias y lactobacilos, mientras que disminuyen las *E. coli* (Gerdes, 2005).

El almidón resistente incrementa la producción de butirato en el colon. Los estudios demuestran que el butirato pudiera proteger contra el cáncer de colon y es también la fuente de energía preferida por las células colónicas (Cummings *et al.*, 2001; Gerdes, 2005). De los tres ácidos grasos de cadena corta, el butirato es el que tiene mayor efecto trófico sobre la mucosa (García *et al.*, 2002). El efecto trófico de los AGCC se realiza por diferentes

mecanismos, como aumento del aporte directo de energía, incremento del flujo sanguíneo al colon, aumento en la producción enzimática del páncreas exócrino, estimulación del sistema nervioso y producción de enterohormonas (García y Velasco, 2007).

Numerosos trabajos señalan la posibilidad de que los prebióticos puedan ejercer acciones favorables, relacionados con el estreñimiento, diarreas asociadas con infecciones intestinales, la osteoporosis (al incrementar la biodisponibilidad del calcio), aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (al corregir la dislipidemia y la resistencia insulínica), obesidad, diabetes mellitus tipo 2 e incluso contra el cáncer colorrectal (St-Onge et al, 2000; Scholz-Ahrens *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2001; Delzenne y Williams, 2002; Williams y Jackson, 2002; Balcázar-Muñoz *et al.*, 2003; Bongers y van den Heuvel, 2003; Marti *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2003; Ros, 2003; Oliveira y González-Molero, 2007).

Se ha demostrado en experimentación animal el efecto protector de los prebióticos en el cáncer de colon, por su efecto sobre las bacterias intestinales, su contribución a la modulación de la inmunidad entérica y la protección frente a los efectos de los carcinógenos. La administración de una dieta con oligofruktosa e inulina disminuyó la incidencia de criptas aberrantes en el colon distal del ratón después de la exposición a dimetilhidracina y la incidencia y mortalidad por infecciones entéricas y sistémicas. Se estima que la resistencia a la infección se explicaría como una respuesta inmunológica positiva debida al cambio metabólico de las bacterias residentes en el intestino inducido por los prebióticos (Wolowski Pool-Zobel, 2001; Buddington, 2002; Burns y Rowland, 2003; Pavón y Guillán, 2005). Un efecto similar para la protección del desarrollo de criptas aberrantes en el colon de ratas se demuestra con la administración de simbióticos, compuestos por una asociación de *Bifidobacterium longum* e inulina (Tojo *et al.*, 2003). La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, la cual beneficia al huésped mediante el aumento de la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal (Schrezenmeier y de Vrese, 2001; Oliveira y González-Molero, 2007).

Aún está poco estudiada esta combinación, que 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. 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 beneficiosos para la salud (Roberfroid, 2000). Un ejemplo de este sinergismo lo constituye la relación de la cantidad de fibra dietética en la dieta con la microflora intestinal: una dieta con bajo contenido en fibra puede producir cambios en la ecología de la microflora intestinal y una disminución en la población de *Lactobacillus* con aumento de bacteroides capaces de desdoblar los ácidos biliares secundarios en compuestos carcinogénicos, como el deshidronorcoleno y el metilcolantreno (Cagigas y Blanco, 2002).

La combinación simbiótica puede mejorar la estabilidad y supervivencia del probiótico, ya que se dispone rápidamente del sustrato específico para su fermentación, por lo tanto, hay una mayor efectividad que la que produce el microorganismo vivo y el prebiótico por separado (Figuroa *et al.*, 2006). Algunos posibles simbióticos son la combinación de bifidobacterias con FOS y lactobacilos con lactitol (Tojo *et al.*, 2001; Marti, *et al.*, 2003; Tojo *et al.*, 2003).

La inulina y la oligofructosa unidas a un probiótico (*Bifidobacterium longum*) administradas a pacientes con colitis ulcerosa mejoraron las manifestaciones clínicas y redujeron los marcadores inflamatorios de la mucosa intestinal en pacientes con colitis ulcerosa activa. La combinación de fructooligosacáridos y bifidobacterias puede contribuir a la modulación nutricional de la microbiota intestinal y puede reducir el riesgo de cáncer de colon, hecho que se ha observado en experimentación animal (Furrie *et al.*, 2005; Pavón y Guillán, 2005).

Junto al aporte de probióticos, la administración de prebióticos favorece la multiplicación de las bifidobacterias y los lactobacilos, que compiten con los receptores de los patógenos en la mucosa intestinal, favoreciendo por tanto una acción antiinfecciosa (Tojo *et al.*, 2003).

3.5. Plátano

El plátano pertenece a un grupo, probablemente de más de 30 especies conocidas bajo el nombre científico genérico de *Musa*. En su estado silvestre se distribuyen en el hábitat boscoso desde Australia y el Pacífico hasta el norte de India (INIBAP, 2001). Es un

fruto climatérico y, tradicionalmente, su fruto es consumido cuando está maduro (Bello *et al.*, 1999). En plátanos maduros, el 85% de la masa seca está constituido por azúcares, lo que les confiere sabor dulce, mientras que en frutos verdes el principal componente es el almidón (Englyst y Cummings, 1986).

En el Cuadro 9 se observa la composición de la harina obtenida de diferentes variedades de plátano cultivadas en Brasil, donde el almidón se encuentra presente como el principal componente; entre el 65.7% y el 76.5% (Mota *et al.*, 2000). Muyonga (2001) obtuvo harina de *Musa cavendishii* con 75.90% de almidón, 9.29% de humedad, 1.51% de proteína cruda, 0.32% de grasa cruda, 0.95% de fibra cruda, 2.69% de cenizas, 9.41% de azúcares totales y pH de 5.58.

El contenido de almidón resistente reportado por Lehman *et al.* (2002) para *Musa acuminata* en almidón nativo es de 95.1%, mientras que en almidón retrogradado, el contenido fue de 84%. Al estudiar la biodisponibilidad del almidón de plátano se encontró que en la especie *Musa paradisiaca* este almidón contiene entre 50% y 60% de almidón resistente (Bello *et al.*, 2000).

Cuadro 9. Composición proximal de harina de plátano de variedades cultivadas en Brasil.

Composición	Prata comum (%)	Ouro da mata (%)	Nanica (%)	Nanicão (%)
Humedad	5.58 ± 0.43	4.69 ± 0.36	6.17 ± 0.13	4.17 ± 0.42
Proteínas	2.5 ± 0.02	2.8 ± 0.13	2.8 ± 0.19	2.6 ± 0.20
Grasas	0.58 ± 0.48	0.33 ± 0.35	0.78 ± 0.51	0.82 ± 0.47
Cenizas	2.8 ± 0.06	2.6 ± 0.06	3.5 ± 0.06	3.0 ± 0.06
Almidón	72.4 ± 3.6	65.7 ± 2.8	76.5 ± 2.9	76.1 ± 3.7
Fibra dietética soluble	3.05 ± 0.12	2.10 ± 0.15	2.39 ± 0.10	2.18 ± 0.09
Fibra dietética insoluble	7.41 ± 0.4	6.85 ± 0.2	5.37 ± 0.2	4.10 ± 0.1

Fuente: Mota *et al.*, 2000.

3.6. Residuos cítricos

La citricultura es una actividad agrícola importante en México, especialmente en el sureste. La superficie sembrada en el país con naranja es de aproximadamente 346,010 Ha (INEGI, 2003). Los cítricos producidos en México son canalizados hacia el consumo directo o procesado industrialmente para la producción de jugos. El mercado internacional de jugos cítricos ha experimentado un crecimiento continuo durante los últimos decenios, en gran parte por la introducción de importantes innovaciones técnicas y por el desplazamiento en el comercio internacional hacia los jugos concentrados congelados para su reconversión en jugos de concentración natural (Domínguez, 1995).

La naranja es el principal de todos los cítricos procesados (80%) seguido de la toronja (9%), los limones (6%) y las mandarinas (5%). Cuando las frutas cítricas se procesan para obtener jugos, quedan como residuos del 45 al 60% de su peso en forma de cáscaras, hollejos y semillas. Debido al elevado contenido de agua y al carácter perecedero del residuo, sólo puede utilizarse rentablemente cerca de la fábrica elaboradora. El material fresco es difícil de manipular y fermenta rápidamente convirtiéndose en un foco de contaminación ambiental. La deshidratación ha sido la forma más utilizada para su conservación y posterior empleo en la alimentación animal. Para llevar a cabo el proceso de deshidratación es necesario añadir un 0.5 % de hidróxido de calcio con el propósito de eliminar la naturaleza hidrofílica de la pectina, seguido de un prensado para disminuir la humedad. Por su alto volumen de producción, su fina textura y por sus propiedades organolépticas, la harina o harinilla de cítricos, constituye un importante material factible de ser utilizado en las dietas de animales monogástricos (Pérez *et al.*, 1988).

La pulpa de cítricos deshidratada debido a su nivel de fibra ha sido utilizada principalmente en la alimentación de rumiantes. Sin embargo, existen evidencias de que los residuos de frutas cítricas pueden ser utilizados como fuentes de energía para la alimentación de cerdos en la etapa de crecimiento-ceba (Ku *et al.*, 1993).

En general, la pulpa de cítricos es deficiente en proteína cruda (rango de 5.5 a 8.1%) y muestra una elevada desaparición de la materia seca en el rumen (80% a las 15 h de incubación) lo cual sugiere que tiene una elevada fracción soluble. La pulpa de cítricos es un subproducto con un contenido de fibra cruda bajo (11.0% en base seca) y la digestibilidad de

la fibra detergente neutro es alta (71.03%). Posee una alta concentración de ácido aspártico, ácido glutámico y prolina, pero contiene cantidades marginales de lisina (Ku *et al.*, 1993). En el Cuadro 10 se muestra un análisis proximal de pulpa fresca y deshidratada.

La cáscara de cítricos es una buena fuente de pectinas. Las pectinas comerciales son galacturonoglicanos con un contenido variable de grupos metil éster, mientras que las pectinas nativas son moléculas más complejas encontradas en la pared celular e intracelular de las plantas. Algunas pectinas son solubles en agua, otros como protopectinas no son solubles. En la extracción de pectina se han utilizado muy diferentes ácidos, entre los que se encuentran el sulfúrico, clorhídrico, nítrico y cítrico (Kim *et al.*, 2000).

Cuadro 10. Análisis proximal de pulpa de naranja fresca, deshidratada y en harina.

Determinación	Pulpa fresca¹ (%)	Pulpa deshidratada² (%)	Harina³ (%)
Materia seca	21.0	89.0	94.2
Proteína cruda	7.6	7.9	6.6
Fibra cruda	17.7	11.2	12.8
Extracto etéreo	4.5	2.0	3.2
Cenizas	4.5	4.9	7.3
Extracto libre de Nitrógeno	65.7	74.0	70.1

Fuente: ¹Coppo *et al.*, 2002; ²Domínguez, 1995; ³Dixon, 1977.

4. METODOLOGÍA

4.1. Sistema modelo

4.1.1. Estructura. La Figura 2 muestra un diagrama del modelo del colon. Se construyó con tres partes principales: 1) sistema de fermentación, 2) sistema de absorción y 3) bomba peristáltica. La Figura 3 muestra el reactor tubular (A) elaborado en vidrio de 5 cm de diámetro interno y 50 cm de longitud, con los extremos esmerilados (Travilab®). Para el sistema de absorción se utilizaron dos conductos situados a 10 cm de cada extremo del reactor tubular, a través de los cuales se circuló una solución absorbente que simuló el proceso de absorción intestinal. En los extremos del reactor se colocaron dos tapones esmerilados (Figura 3-B), a los cuales se le añadieron dos entradas externas para suministro o salida de sustratos y muestreo, así como una interna para sostén de una membrana de diálisis. El sistema se mantuvo a 37°C en estufa bacteriológica (New Brunswick G25 incubator, New Brunswick Scientific Co., Edison NJ, USA).

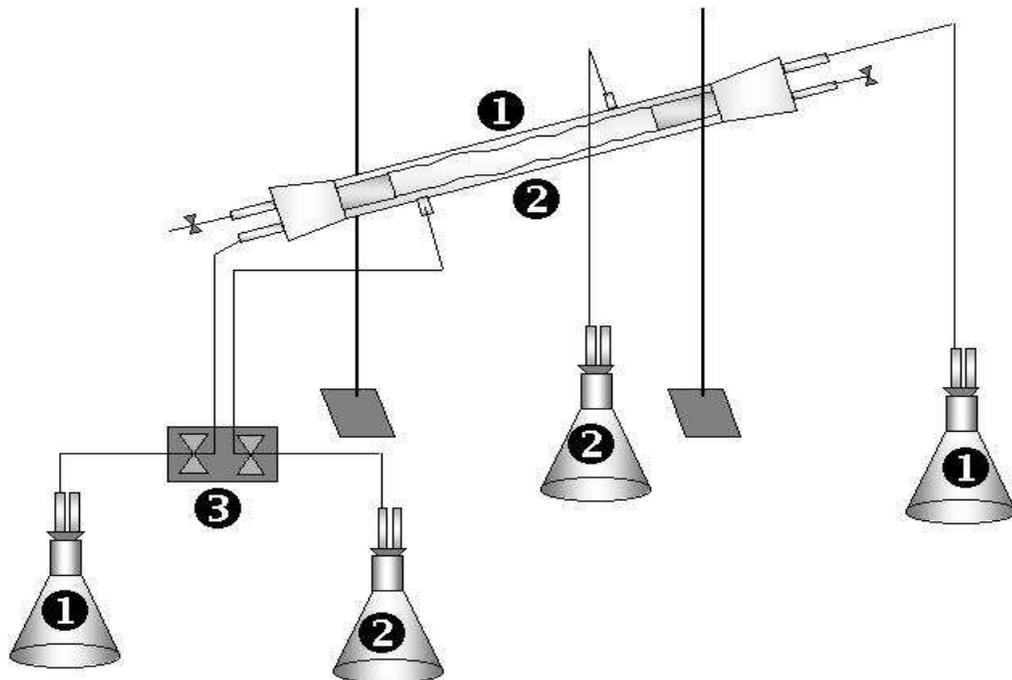


Figura 2. Diagrama del sistema modelo del colon proximal humano: 1) sistema de fermentación, 2) sistema de absorción y 3) bomba peristáltica.

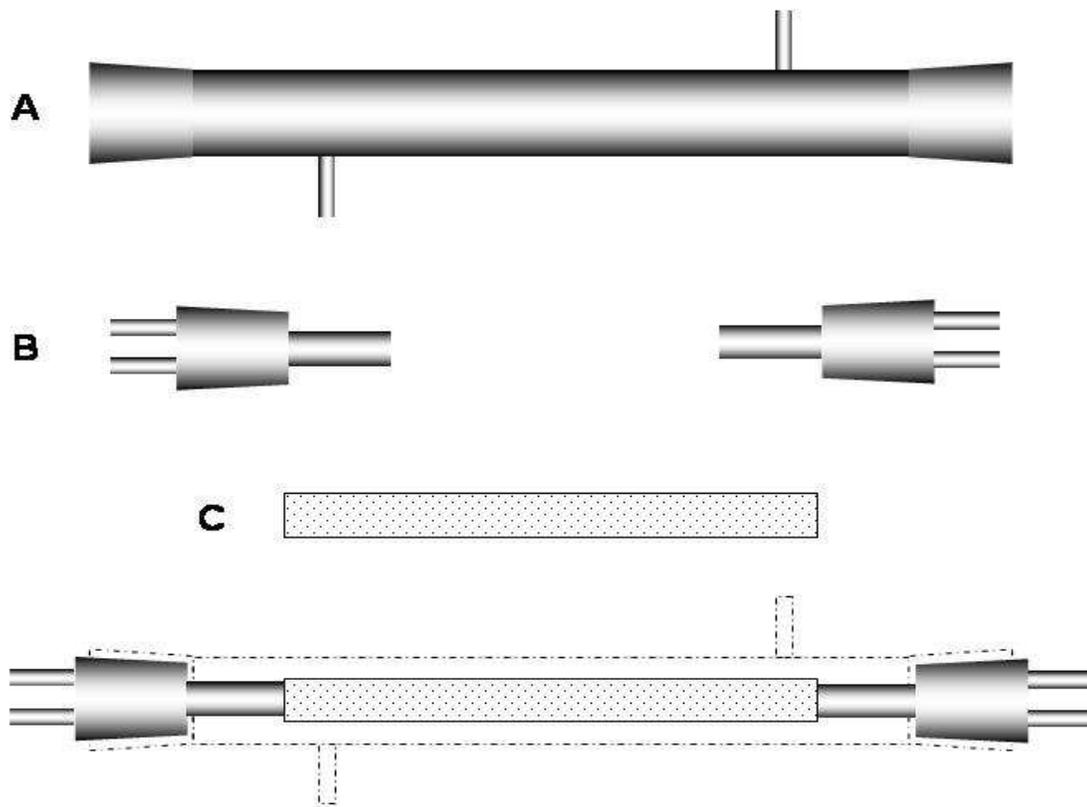


Figura 3. Tubo de fermentación central (A) con tapones esmerilados (B) y membrana de diálisis (C).

4.1.2. Inóculo. Se utilizaron tres caldos de cultivo para la propagación *in vitro* de microflora fecal: caldo de soya tripticaseína (TSB, Difco), caldo infusión de cerebro y corazón (BHI, Bioxon) y caldo tioglicolato (CT, Difco). Se preparó una solución fecal (SF) al 20% con agua destilada estéril y se filtró a través de gasa estéril para eliminar residuos alimentarios. Las heces se obtuvieron de tres adultos sanos, sin trastornos gastrointestinales, y sin consumo de antibióticos tres meses previos a la donación de la muestra fecal (Macfarlane, 1998). Se inocularon 10.0 ml de solución fecal en 100.0 ml de cada caldo de cultivo. Se incubaron a 37°C durante 24 h en aerobiosis, sin agitación. Se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1.0 ml del caldo correspondiente adicionado con glicerol al 20% (Booher *et al.*, 2002). Se congeló para utilizarse como inóculo fuente. Para propagar el nuevo inóculo se descongeló el inóculo fuente a temperatura de refrigeración; se adicionaron 100 µl a 10.0 ml del caldo correspondiente. Se incubaron a 37° C durante 24 h, sin agitación. Se centrifugaron y congelaron a las condiciones descritas en el párrafo anterior. Se evaluó durante un año la

resistencia de los microorganismos a la congelación. Se cuantificaron bacterias aerobias y anaerobias en los tres caldos y en solución fecal al 20% como referencia, así como ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico).

4.1.3. Absorción. Para simular la absorción se evaluaron dos soluciones:

a) Solución 1. Solución salina a diferentes concentraciones de NaCl 8.5 g/l, 17.0 g/l, 25.5 g/l, 34.0 g/l y 42.5 g/l.

b) Solución 2. Solución compuesta por 26.25 g/l de polietilenglicol 4000 (Fluka, EC no. 2034733, Sigma Aldrich, Switzerland), 0.36 g/l de bicarbonato de sodio (J. T. Baker, 3506-20, México) y 0.7 g/l de cloruro de sodio (J. T. Baker, México).

Para las dos soluciones se evaluaron dos condiciones de pH (7.0 y 9.5) y dos velocidades de introducción de la solución al modelo (1.8 ml/min y 3.6 ml/min). Se utilizó una membrana de diálisis tubular de 33 mm de diámetro (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) y tamaño de poro de 12,000 Da (Figura 2-C).

4.1.4. Condiciones de fermentación. El sistema modelo se mantuvo a 37°C en una estufa de incubación aerobia, con puerta de abertura horizontal (New Brunswick Scientific, USA), como parte de uno de los requerimientos para reproducir los patrones de fermentación del colon proximal. Además, se evaluaron tres posiciones del biofermentador: horizontal, vertical e inclinado a 45°.

4.1.5. Alimentación. Se evaluaron tres formulaciones de alimentos:

a) Alimento 1. Formulada por croquetas para perros (Best Choice, Malta Cleyton, Estados Unidos).

b) Alimento 2. Elaborado de pan blanco (Bimbo, México) y atún (Nair, México).

c) Alimento 3. Compuesto por carbohidratos (Mega Mass, complemento nutricional para deportistas, Goleen Harvest, México), proteínas (Albúmina de huevo, ProWinner Pronat, México), fibra (Fibra de trigo, Los Volcanes, México) y almidón (Almidón de trigo Selecta,

México). Los alimentos fueron elaborados a dos niveles de pH (5.5 y 8.0) y dos porcentajes de humedad (85 y 90%).

Cuadro 11. Composición proximal de las formulaciones evaluadas como sustrato para el modelo.

Composición	Alimento 1 (%)	Alimento 2 (%)	Alimento 3 (%)
Carbohidratos	43	49	64
Fibra	4	ND	3
Almidón	ND	ND	3
Proteínas	21	35	35
Grasa	9	6.4	1

ND: No determinado.

El alimento se introdujo en la membrana de diálisis para su fermentación. Al inicio del proceso se adicionaron 150 g de alimento junto con el inóculo fecal, mediante una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer Instruments Company, Vernon Hills, IL USA) a una velocidad de 5.0 g/min. En las alimentaciones sucesivas, solamente se adicionaron 100 g de alimento sin inóculo fecal. Se evaluaron dos tipos de alimentación: una vez al día y tres veces al día, simulando una alimentación típica. Para evaluar la sensibilidad del modelo a cambios inducidos en la microflora se adicionaron 3.0 g de inulina (Sigma) al día; 1.0 g en cada alimentación.

4.2. Almidón de plátano

Se utilizaron frutos de plátano cuadrado (*Musa balbisiana* Colla) colectados en plantaciones localizadas en Tabasco, México, con grado de madurez tipo I, que corresponde aproximadamente a 80 días después de la polinización. Se elaboró harina a partir de frutos sin cáscara cortados en rodajas de aproximadamente 1-2 mm de grosor, se secó en estufa a 55°C durante 24 h. Se molió (Ciclotek) y tamizó en malla 80 (Mota *et al.*, 2000). Se extrajo el almidón nativo utilizando una solución de bisulfito de sodio (Sigma C-4208) al 1% en relación 10:1 con la harina. Se agitó durante una hora con agitador magnético (Caframo) a 400 rpm. Se tamizó en malla 80 y 100. El producto tamizado se mantuvo en reposo durante una hora y

se eliminó el sobrenadante por sifoneo. Se realizaron tres lavados a relación 1:3 con agua destilada y se secó a 55°C por 24 h; se molió y tamizó en malla 80 (De la Torre, 2004).

4.2.1. Almidón resistente tipo II de plátano. Para obtener este tipo de almidón resistente se agregaron 18 g de almidón nativo de plátano a 150 ml de solución amortiguadora de fosfato a pH 6.9 conteniendo 14 mg de enzima α -amilasa (Sigma). Se incubó a 37°C durante 18 h, realizándose tres lavados al término de la incubación. Se repitió la incubación a condiciones semejantes a las anteriores durante 4 h. Se realizaron tres lavados, se secó a 55°C, se molió y tamizó en malla 80 (Martin *et al.*, 1998).

4.2.2. Almidón resistente tipo III de plátano. Se obtuvo a partir de una solución de almidón nativo de plátano al 20% y sometida al autoclave durante 30 min a 121°C. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente se secó a 55°C, se molió y tamizó en malla 80. El tratamiento enzimático se realizó de igual manera que para el almidón resistente tipo II (Lehman *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 1998).

4.3. Fibra de naranja

Se utilizaron residuos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) provenientes de expendios de jugos de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. A los residuos sin jugo se les eliminó el flavedo y las semillas manualmente.

4.3.1. Harina de fibra de naranja. Los residuos fibrosos desflavelados se cortaron en cuadros de 0.5 cm aproximadamente y se secaron a 55°C en estufa durante 12 h. Posteriormente se molieron en molino Ciclotek, se tamizaron en malla 80 y se almacenaron en recipientes de plástico cerrados (Quijano, 1995).

4.3.2. Pectina. La extracción de pectina se realizó calentando a 95°C 25 g de harina de fibra de naranja en 3.0 l de agua a pH 2 (HCl 1.0 N) durante 90 min. Se mantuvo en reposo por 30 min y se filtró en tela de nylon de malla 200. La pectina se precipitó con 1.5 volúmenes de etanol de 96°, se filtró y secó a 55°C durante 24 h (Camejo *et al.*, 1996).

4.4. Evaluación de almidón y fibra en el modelo

Se evaluó el efecto en la microflora intestinal al adicionar 3 g/día de almidón resistente II, almidón resistente III, harina de naranja y pectina empleando el modelo de colon proximal desarrollado en este trabajo. Se utilizó inulina y harina de trigo como referencias. El modelo se utilizó con las siguientes condiciones:

a) Alimentación. Todos los ensayos fueron realizados con el alimento 3 a pH 8 y 90% de humedad.

b) Sistema de absorción. Se utilizó la solución 2 a pH de 9.5 y flujo de 1.8 ml/min.

Al inicio de la fermentación se introdujo en el biorreactor el alimento y el inóculo fecal sin sustrato a evaluar. A las 6, 12 y 18 h, se agregó 1.0 g de sustrato junto con el alimento. En el muestreo de 24 y 30 h no se agregó alimentación ni sustrato a evaluar.

4.5. Técnicas analíticas.

4.5.1. Análisis fisicoquímicos. Para medir el pH de los almidones y las harinas se pesaron 10 g de muestra y se disolvieron en 100 ml de agua libre de CO₂ a 25°C (AACC, 1990). Los análisis proximales se realizaron empleando métodos de la AOAC (1997). La humedad (método 925.09) se determinó empleando crisoles a peso constante: se pesó 1.0 g de muestra y se mantuvo a 130°C durante 4 h. Para la obtención de cenizas (método 923.03) se calcinó la muestra en mufla a 450°C durante 5 h. La cuantificación de nitrógeno (método 954.01) se realizó por el método Kjeldahl (Tecator, Sweden) consistiendo en una digestión ácida de la muestra y luego una destilación alcalina; se utilizó el factor 6.25 para la conversión del nitrógeno a proteína. El extracto etéreo (método 920.39) se determinó realizando extracciones con hexano empleando 1.0 g de muestra en equipo Soxhtec® (Tecator, Sweden). La fibra cruda (método 962.09) se calculó después de su digestión ácida y alcalina en un sistema Fibertec (Tecator, Sweden). El extracto libre de nitrógeno (E.L.N.) se obtuvo por diferencia del resto de los componentes.

Los análisis químicos comprendieron la determinación de almidón total (Tovar *et al.*, 1990) y almidón resistente (Goñi *et al.*, 1996) para los que se utilizaron métodos enzimáticos.

La cuantificación de fibra dietética total se realizó por el método de Prosky *et al.* (1998) y fibra dietética soluble e insoluble, por métodos enzimáticos de la AOAC (1997).

4.5.2. Recuento microbiano. Para evaluar el proceso de fermentación en el sistema modelo se cuantificaron los microorganismos que se muestran en el Cuadro 12. El crecimiento se evaluó empleando un método modificado de siembra en superficie (Corona y Jiménez, 2004), se depositaron 5 µl de cada dilución (hasta 10⁻¹⁰) en una caja de Petri con agar selectivo para cada microorganismo. Para obtener el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) se contaron las colonias de la dilución mayor y se multiplicó por 200 (para obtener 1 ml) y por el inverso de la dilución. Los aerobios se incubaron 24 h a 37°C y los anaerobios, 48 h a 37°C en jarra con sistema BBL (GasPack, Merck) generador de gas anaerobio.

Cuadro 12. Medios de cultivo empleados para cada grupo de microorganismos evaluados.

Microorganismos	Medio de cultivo	Marca
Aerobios totales	Agar nutritivo	Dibico
Enterobacterias	Agar MacConkey	Bioxon
Coliformes	Agar de bilis y rojo violeta	Dibico
Lactococos	Agar M-17	Oxoid
Enterococos	Agar sangre con azida	Bioxon
Anaerobios totales	Agar anaerobio	Difco
Anaerobios facultativos	Agar nutritivo	Dibico
Lactobacilos	Agar Rogosa	Difco
Bifidobacterias	Agar de Beerens	Preparado ¹
Clostridios	Agar <i>Clostridium</i>	Fluka
Bacteroides	Agar sangre nemocina anaerobio	Remel

¹Preparado en el laboratorio de acuerdo a Beerens (1990), modificado por Beerens (1991).

4.5.3. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta. Se analizaron tres ácidos de cadena corta (AGCC): ácido acético, propiónico y butírico, en cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 series II) equipado con columna capilar AT-1000 y detector de ionización de flama a una temperatura del horno de 120°C, temperatura de inyector de 130°C

y temperatura del detector de 150°C. La concentración de los ácidos grasos fue calculada usando estándar externo. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C; 950 µl del sobrenadante y 50 µl de ácido clorhídrico al 50% fueron colocados en tubo Eppendorf; después de ser homogenizados se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue congelado hasta ser analizado.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados fueron presentados como media \pm desviación estándar. Los ensayos en el modelo fueron realizadas por duplicado y las determinaciones analíticas, por triplicado.. La concentración de bacterias por ml de muestra fue convertida a logaritmo en base 10 y analizada por procedimientos de ANOVA del programa estadístico de cómputo Statgraphics Plus versión 6.1. Las diferencias entre las medias fueron considerados estadísticamente diferentes a una probabilidad de $P < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**5.1. Inóculo fecal**

Se evaluaron diferentes medios de cultivo para obtener biomasa fecal para emplearse como inóculo. El Cuadro 13 muestra la concentración bacteriana de los cultivos a las 24 h. En caldo soya tripticaseína (TSB) y caldo de cerebro y corazón (BHI) se logró el crecimiento de todos los principales microorganismos fecales, mientras que en caldo tioglicolato (CT) no se obtuvo crecimiento de coliformes ni enterobacterias. En BHI se obtuvo la máxima concentración de mesófilos aeróbicos, enterobacterias, coliformes, lactococos, enterococos, anaerobios totales, anaerobios facultativos, clostridios y bacteroides mientras que en CT, lactobacilos y bifidobacterias. La concentración de bifidobacterias, bacteroides y lactobacilos en solución fecal (SF) fue menor que en los cultivos.

Cuadro 13. Concentración bacteriana en caldos a las 24 h de cultivo y solución fecal.

Microorganismos	TSB (Log ₁₀ UFC/ml)	CT (Log ₁₀ UFC/ml)	BHI (Log ₁₀ UFC/ml)	SF (Log ₁₀ UFC/ml)
Mesófilos aerobios	8.73 ± 0.85 ^a	7.11 ± 0.14 ^b	9.19 ± 0.16 ^a	7.25 ± 0.49 ^b
Enterobacterias	6.07 ± 0.80 ^a	0 ^b	8.60 ± 0.10 ^a	7.20 ± 0.57 ^a
Coliformes	5.93 ± 0.65 ^a	0 ^b	8.60 ± 0.15 ^c	7.05 ± 0.35 ^a
Lactococos	8.43 ± 0.32 ^{ac}	6.93 ± 0.14 ^b	9.25 ± 0.07 ^c	7.95 ± 0.49 ^{ab}
Enterococos	8.60 ± 0.26 ^a	7.24 ± 0.21 ^a	8.69 ± 0.13 ^a	7.00 ± 0.14 ^a
Anaerobios totales	9.07 ± 0.40 ^a	6.76 ± 0.49 ^b	9.54 ± 0.34 ^a	7.45 ± 0.49 ^b
Anaerobios facultativos	8.13 ± 0.76 ^a	3.97 ± 0.56 ^b	8.80 ± 0.28 ^a	6.30 ± 1.41 ^a
Lactobacilos	7.00 ± 0.26 ^a	7.24 ± 0.21 ^a	6.95 ± 0.07 ^a	5.30 ± 0.00 ^b
Bifidobacterias	6.83 ± 0.21 ^a	7.21 ± 0.19 ^a	7.14 ± 0.08 ^a	4.15 ± 0.21 ^b
Clostridios	7.30 ± 0.30 ^a	7.24 ± 0.21 ^a	8.45 ± 0.21 ^b	7.10 ± 0.28 ^a
Bacteroides	7.81 ± 0.34 ^{ab}	7.13 ± 0.14 ^a	8.10 ± 0.28 ^b	5.10 ± 0.20 ^c

Letras diferentes en la misma línea presentaron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

En la Figura 4 se observa el crecimiento en TSB y BHI de los grupos bacterianos a las 0, 6, 12, 18 y 24 h en cultivo por lote. Fue notorio que en las primeras 6 h se obtuvo el mayor crecimiento de todos los grupos microbianos en ambos cultivos. Después de alcanzar

la máxima concentración, en ambos caldos se mantuvo constante la población bacteriana hasta las 24 h.

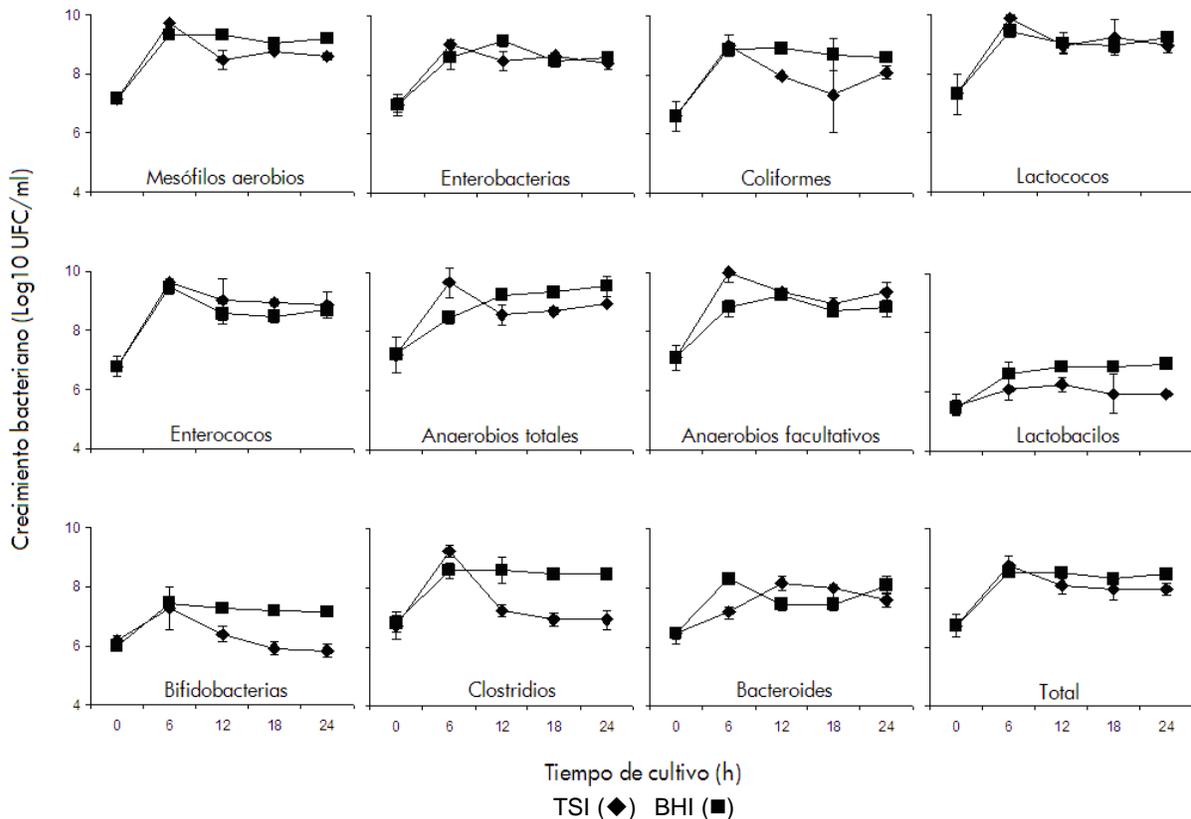


Figura 4. Crecimiento de bacterias fecales en cultivo por lote durante 24 h.

La microflora fecal es una comunidad compleja debido a las relaciones metabólicas entre sus grupos microbianos (Guarner, 2002). Con el empleo de medios comerciales como TSB y BHI fue posible propagar la microflora de esta comunidad. Estos caldos se han empleado para el cultivo de diversos microorganismos, incluyendo algunos de difícil crecimiento como *Brucella abortus* (Leyán *et al.*, 2005), *Vibrio parahaemolyticus* (Magallanes *et al.*, 2003) así como anaerobios facultativos y hongos (Zamora *et al.*, 2006). Además, han sido utilizados como medio base en estudios relacionados con la flora intestinal humana (Miyake *et al.*, 1997) y animal (Feder *et al.*, 2001).

En heces se han identificado diferentes grupos bacterianos empleando medios de cultivo tradicionales. Se han aislado bacterias como *Escherichia coli* (Macías *et al.*, 2002),

Enterococcus (Cheng-Tang *et al.*, 1998), *Clostridium perfringens* (Lederman *et al.*, 2004) *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Cheng-Tang *et al.*, 1998). Estos microorganismos han sido aislados en medios de cultivo selectivos y en condiciones adecuadas para el crecimiento del cultivo puro. Aunque el cultivo realizado en TSB y BHI fue mixto, no se presentó inhibición entre grupos microbianos. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos encontrados en adultos tanto para anaerobios como bifidobacterias (10-11 Log₁₀ UFC/g), lactobacilos (7-9 Log₁₀ UFC/g), clostridios (6-10 Log₁₀ UFC/g) y bacteroides (10-11 Log₁₀ UFC/g), así como para aerobios: enterococos (5-7 Log₁₀ UFC/g) y enterobacterias (6-8 Log₁₀ UFC/g) (Ouwehand *et al.*, 2002; Lenoir-Wijnkoop y Hopkins, 2003). No obstante, la concentración de los microorganismos anaerobios en los caldos de cultivo fue significativamente mayor que la encontrada en la solución fecal de la cual procedieron. Estos resultados pueden explicarse en razón de que la solución fecal fue sometida a transporte y manipulación antes de ser evaluada, mientras que en los cultivos, dicha manipulación fue mínima.

Debido a las condiciones de anaerobiosis en el tracto intestinal, se incluyó el caldo tioglicolato, diseñado para el estudio de microorganismos anaerobios (Alcamo, 2001), pero no se obtuvo crecimiento de enterobacterias y coliformes. Esta inhibición pudo deberse a la presencia de ácido tioglicólico en este medio de cultivo, ya que se ha reportado su efecto inhibitorio en algunas bacterias (Sutton *et al.*, 2002; Murata, 2006).

Para el caso particular de bifidobacteria, se han reportado concentraciones de 10 Log₁₀ UFC/g y 11 Log₁₀ UFC/g en heces (Wang *et al.*, 2005; Priebe *et al.*, 2002; Lenoir-Wijnkoop y Hopkins, 2003). No obstante, los valores obtenidos en los cultivos evaluados se encuentran por debajo de estos rangos. Estos resultados se pueden deber a la baja concentración de este microorganismo en las heces de los donantes. De igual manera, la manipulación fue un factor que pudo haber afectado su concentración.

El efecto del tiempo de almacenamiento en congelación se muestra en la Figura 5. A los seis meses de almacenamiento no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la concentración inicial y final de los grupos bacterianos. Sin embargo, a los 12 meses, se encontró una marcada disminución en la concentración de todos los grupos; especialmente en enterobacterias, donde la concentración fue de menos de 2.0 log₁₀ UFC/ml y en

bifidobacterias, las cuales no fueron detectadas al año de almacenamiento. La conservación en congelación empleando glicerina como crioprotector es un método sencillo y económico para la conservación de cepas bacterianas. No obstante de acuerdo a los resultados, este proceso sólo puede aplicarse por corto tiempo.

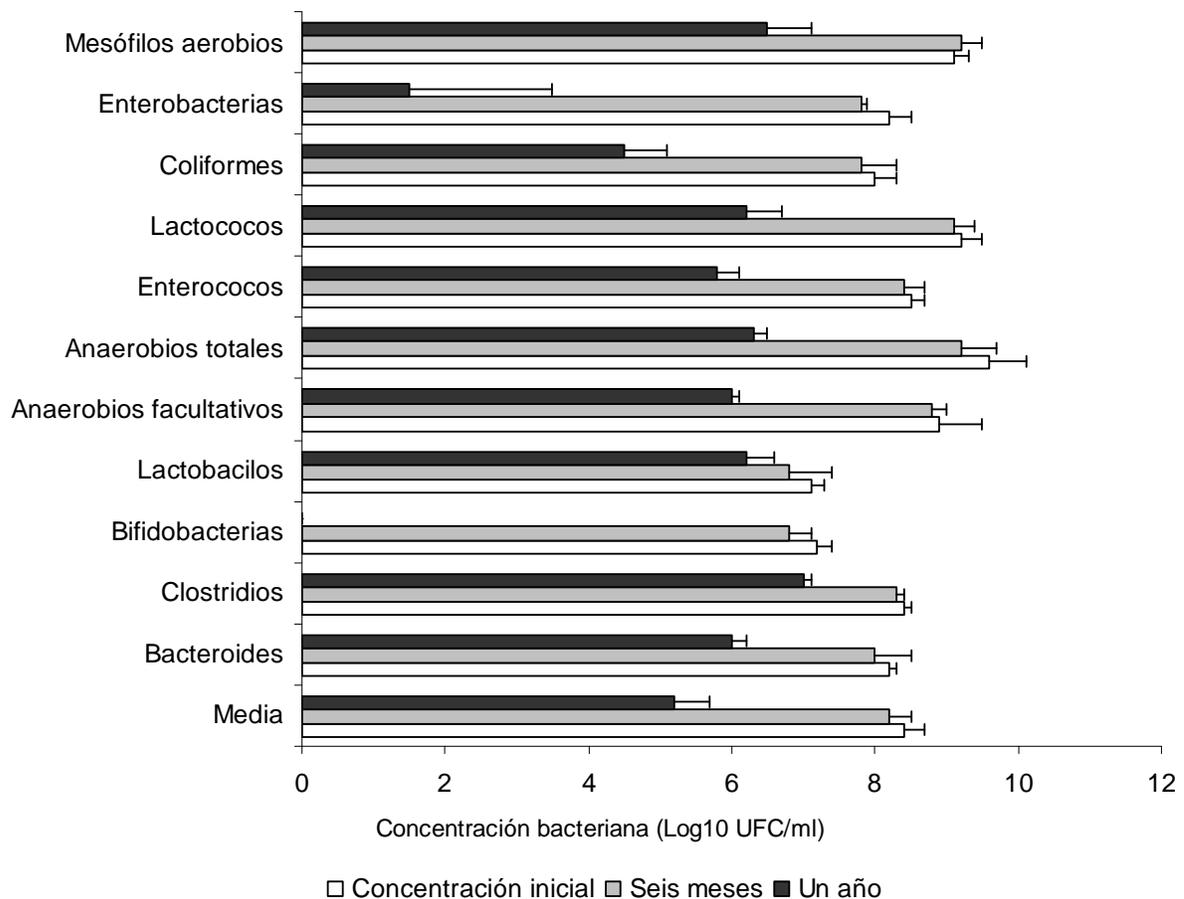


Figura 5. Efecto de la congelación en la concentración bacteriana.

El glicerol adicionado a la microflora propagada permitió mantenerla en congelación durante seis meses, sin que alguno de los grupos presentara diferencia significativa en la concentración. El glicerol ha sido empleado en la conservación de células como bacterias (Valdez *et al.*, 1983; Crespo *et al.*, 2000; Zamora *et al.*, 2006) y glóbulos rojos en congelación (Valeri *et al.*, 2000). Existen reportes de que en heces congeladas, algunos grupos como los anaerobios totales y bifidobacteria disminuyen su concentración significativamente (Guérin-Danan *et al.*, 1999). Es importante señalar que la sencillez de la técnica, la disponibilidad

inmediata de la microflora así como las mejores condiciones de manejo hacen de este método una buena opción para la conservación de cultivos mixtos durante seis meses.

Entre los productos principales de las heces se encuentran los ácidos grasos de cadena corta identificados como acético, propiónico y butírico. Las concentraciones de estos ácidos en los cultivos de biomasa fecal se muestran en el Cuadro 14. No se encontraron diferencias estadísticas en la concentración del ácido acético y propiónico por efecto de TSB, BHI y SF, pero si en el ácido butírico. La concentración de ácido butírico fue menor en TSB y BHI que en la solución fecal. Este resultado puede ser explicado debido a la ausencia de algún nutriente que estimule la producción de este ácido en particular o de alguna bacteria productora de este metabolito.

Cuadro 14. Concentración de ácidos grasos de cadena corta en TSB, BHI y la solución fecal a las 24 h de cultivo.

Ácidos grasos De cadena corta	TSB (mmol/ml)	BHI (mmol/ml)	SF (mmol/ml)
Acético	10.47 ± 0.49 ^a	11.74 ± 0.15 ^a	9.98 ± 0.63 ^a
Propiónico	1.67 ± 0.01 ^a	1.72 ± 0.01 ^a	2.49 ± 0.42 ^a
Butírico	0.07 ± 0.04 ^a	0 ^a	2.18 ± 0.06 ^b

Letras diferentes en la misma línea presentaron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

Una de las funciones principales de la flora intestinal es la fermentación de los sustratos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio. La fermentación de carbohidratos da lugar a la formación de ácidos grasos de cadena corta, entre los que se encuentran principalmente los ácidos acético, propiónico y butírico (Guarner, 2002). La concentración de ácido butírico estuvo por debajo de la obtenida en la solución fecal, este resultado puede estar relacionado con la viabilidad de los microorganismos productores de este ácido graso de cadena corta probablemente debido a que su producción está relacionada con la fermentación de algún microorganismo. Se ha reportado que *Eubacterium*, peptococos y clostridios como microorganismos productores de butirato (Cummings y MacFarlane, 1991), los cuales son microorganismos anaerobios, por lo que su crecimiento en los medios de cultivo pudo estar limitado.

5.2. Sistema modelo

5.2.1. Sistema de absorción. El modelo desarrollado en este trabajo fue diseñado para reproducir las condiciones de fermentación y absorción del colon proximal humano. Es un sistema de fermentación continuo dentro de una membrana de diálisis que permite eliminar el producto de la fermentación por medio de la absorción simulada por una corriente de solución absorbente. En este sistema modelo, se evaluó la composición, pH y humedad adecuadas del alimento suministrado con la finalidad de obtener concentraciones bacterianas similares a las presentes en el colon proximal. La función principal de la flora colónica es la fermentación de sustratos no digeridos en el intestino delgado, sin embargo, el balance microbiano en este sitio determina las sustancias que pueden ser convertidas en compuestos benéficos o no para el huésped (Guarner, 2002; Percival, 1997). Con la finalidad de que se produzcan los patrones de fermentación del tipo adecuado, se debe mantener dentro del colon las condiciones que promueven el crecimiento y los patrones metabólicos favorables para la mayoría de las bacterias benéficas y otros microorganismos. La alimentación de sustratos así como la adecuada eliminación de los desechos son básicas para mantener las condiciones favorables de fermentación en el intestino grueso humano (Herdt, 1981). El contenido del intestino grueso a nivel del ciego es prácticamente líquido, mientras que debido a la absorción del agua, en el colon descendente y el sigmoides, el contenido posee ya la consistencia características de las heces (Escuredo *et al.*, 1995).

En el intestino grueso humano se producen diversas sustancias provenientes de la actividad metabólica de los grupos bacterianos ahí presentes, sin embargo, la eliminación adecuada de dichos metabolitos hace posible que no ocurra retroinhibición por la acumulación de productos. En este sistema modelo, se propuso simular la absorción como una manera de eliminar los metabolitos producidos, con la finalidad de mejorar el proceso de fermentación y no inhibir la formación de compuestos debido a cambios como pH en el sistema debido a los metabolitos acumulados. Por otra parte, en los sistemas de cultivo simuladores reportados se cuantifica el total de metabolitos producidos, sin tomar en cuenta que en el ser humano, una parte se absorbe en el torrente sanguíneo. Para simular dicha absorción se probaron dos soluciones, una solución salina a diferentes concentraciones y otra compuesta por polietilenglicol, bicarbonato de sodio y cloruro de sodio. Para evaluar la capacidad de absorción de las soluciones se midió la pérdida de peso de un alimento

contenido en una membrana de diálisis. Con la solución de cloruro de sodio aún a la mayor concentración no se observó pérdida de peso del alimento, sino que por el contrario, hubo entrada de la solución salina al interior de la membrana de diálisis. En cambio, con la solución de polietilenglicol, bicarbonato de sodio y cloruro de sodio, se observó una pérdida de peso del alimento de $23.1 \pm 0.15\%$ en 24 h, por lo que se seleccionó esta solución para emplearla en la simulación de la absorción intestinal.

Se encontró que el pH de la solución absorbente estuvo directamente relacionado con el pH del alimento fermentado dentro de la membrana de diálisis. Al emplear solución de polietilenglicol con pH de 5.5, los valores de pH del alimento fermentado estuvieron bajos, cercanos a pH 3.5; sin embargo, al elevar el pH de la solución a 9.5, se obtuvieron valores de pH en el alimento cercanos a los reportados para el colon proximal.

El polietilenglicol es ampliamente utilizado en la preparación para colonoscopías (Forero *et al.*, 2005); es un surfactante no iónico que ha sido utilizado en formulaciones para uso parenteral y ha demostrado no ser tóxico (Thakkar y Murthy, 2005), hidrosoluble y de gran tolerancia fisiológica (Boscá *et al.*, 2002). Las preparaciones del colon con polietilenglicol para colonoscopías diagnósticas, proporcionan resultados de limpieza colónica eficientes, siendo un medicamento seguro, confiable y bien tolerado (Forero *et al.*, 2005). La no aparición de efectos adversos para la solución de PEG ha sido reportada por varios autores, quienes han valorado como muy buena la aceptación de esta por los pacientes, recomendándola especialmente para los pacientes ancianos (Vasallo *et al.*, 2002). Para el modelo, era importante emplear una solución con capacidad de absorber a través de la membrana de diálisis pero sin que resultara tóxica para los microorganismos; esta solución ha sido empleada con éxito en humanos, por lo que su inocuidad estuvo garantizada.

Se evaluaron dos velocidades de alimentación del PEG: 1.8 ml/min y 3.6 ml/min; sin embargo, no se obtuvo diferencia en el crecimiento microbiano ni en la concentración de los ácidos grasos de cadena corta. Los experimentos se realizaron a la menor velocidad (1.8 ml/min) para manejar un menor volumen de solución de PEG. Con el uso de PEG se obtuvieron concentraciones de algunos grupos de microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos semejantes a las reportadas para la región del colon proximal humano (Cummings y Macfarlane, 1991).

5.2.2. Condiciones del modelo. En el ser humano, el alimento procedente del intestino delgado ingresa al colon proximal a través de la región del ciego, y el llenado de éste se lleva a cabo de abajo hacia arriba; en el modelo se evaluó este tipo de alimentación para el tubo central de fermentación colocándolo en posición vertical y alimentándolo desde el extremo inferior. Con este proceso se obtuvo un llenado excesivo de la membrana de diálisis ocasionando desgarres de la membrana, por lo que se evaluó el llenado de la membrana en posición horizontal; en esta posición aumentó la durabilidad de la membrana, sin embargo, el alimento suministrado, al igual que el inóculo, no permanecía dentro de la membrana, sino que escapaba por el extremo opuesto al de alimentación, Debido a lo anterior se evaluó una posición intermedia: se mantuvo el tubo de fermentación en posición inclinada (Figura 1); con esto, se aumentó la durabilidad de la membrana, y al realizar el llenado en la parte inferior, se evitó que el contenido dentro de la membrana saliera por el extremo superior. También se evitó la obstrucción de los conductos de salida para los gases generados durante la fermentación.

5.2.3. Formulación del alimento. El alimento utilizado para simular el contenido colónico del modelo se diseñó de acuerdo a la cantidad y al tipo de alimento que ingresa al colon. La cantidad total de material que entra diariamente al colon es de aproximadamente 60 g de sólidos (Macfarlane y Cummings, 1991), siendo los nutrientes principales los carbohidratos y las proteínas (García *et al.*, 2002; Guarner, 2002).

En los alimentos evaluados, la mayor concentración de carbohidratos (70%) y proteínas (35%) se obtuvo con el alimento 3, mientras que el valor mínimo se obtuvo con el alimento 1, formulado a base de croquetas (carbohidratos, 47% y proteínas, 21%). Es importante la proporción de carbohidratos y proteínas ya que el colon proximal es una región rica en nutrientes, principalmente carbohidratos no digeribles (Christensen, 1985) y proteínas que escapan a la digestión en el intestino delgado (Cummings, 1997; García *et al.*, 2002; Guarner y Malagelada, 2003).

El alto contenido de grasa en el alimento 1 (4.6%) y el alimento 2 (9.0%) representó una dificultad al momento de procesar las muestras para la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta debido a la formación de una doble capa lípidos-agua. Debido al alto contenido de grasa, así como a la ausencia de crecimiento de enterobacterias y coliformes

se decidió eliminar los alimentos 2 y 3, por lo que los ensayos siguientes se realizaron solamente con el alimento 3, compuesto por carbohidratos (Mega Mass) proteínas (Pronat), fibra (Los Volcanes) y almidón (Selecta).

En el alimento 3 se evaluaron dos humedades: 85% y 90%; con la humedad de 90% se obtuvo un mejor manejo, tanto en el paso por los diferentes conductos como para la toma de muestras, ya que el alimento fermentado se mantuvo en forma semilíquida. La Figura 6 muestra el crecimiento bacteriano al utilizar el alimento a pH 8.0 y humedad de 90% y la solución absorbente a pH de 9.5. Entre las 0 h y las 6 h se obtuvo un aumento en el crecimiento de todas las bacterias, seguido de una tendencia a disminuir alrededor de las 18 y 24 h. Los microorganismos con mayor concentración fueron los mesófilos aerobios ($8.59 \pm 0.09 \log_{10}$ UFC/ml), anaerobios facultativos ($8.54 \pm 0.06 \log_{10}$ UFC/ml) y lactococos ($8.54 \pm 0.05 \log_{10}$ UFC/ml).

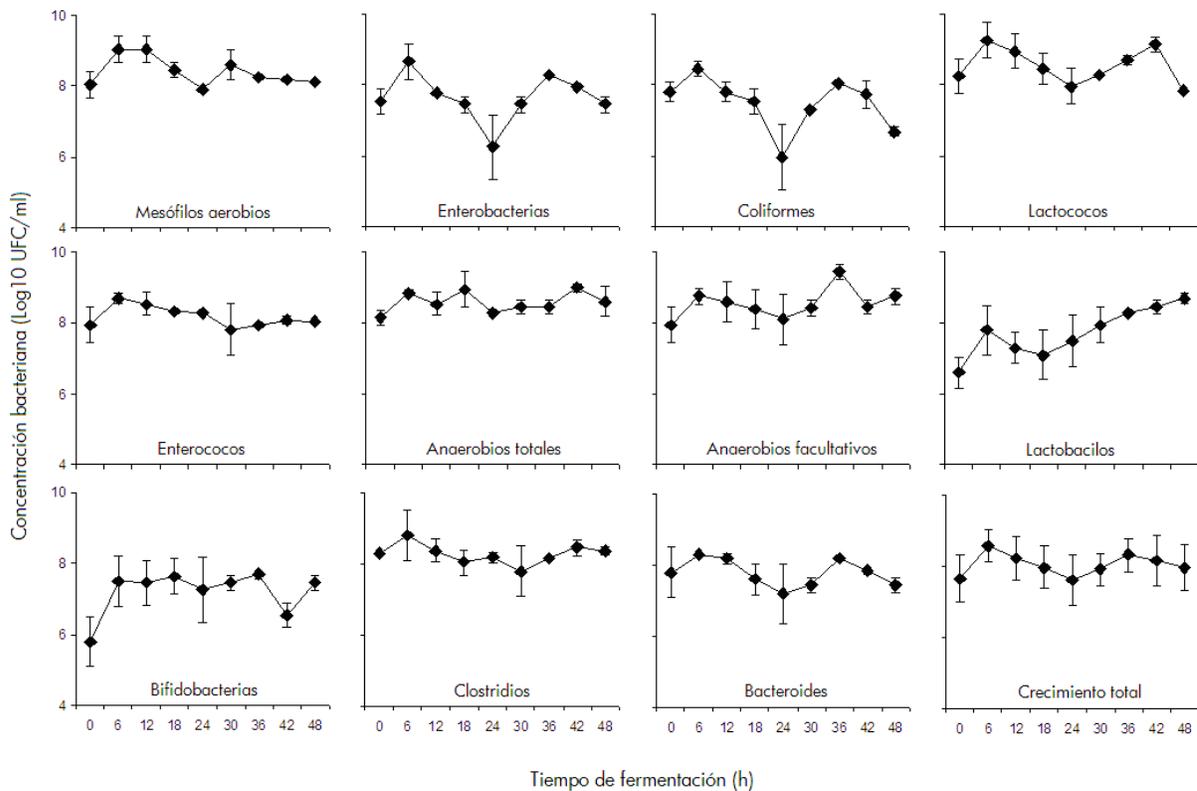


Figura 6. Crecimiento de los diversos grupos microbianos en el modelo de colon durante 48 h de fermentación.

Los resultados obtenidos con este modelo se muestran en la columna C del Cuadro 15, donde se observan valores intermedios entre los reportados por Macfarlane *et al.* (1998) y Van der Werf y Venema (2001), los cuales sirvieron como base para validar sus propios modelos del colon humano. Marteau *et al.* (2001) encontraron que *E. coli* y *Lactobacillus*, ambos anaerobios facultativos, son los microorganismos predominantes en la región del ciego, al igual que Metges (2000), quien menciona que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Escherichia coli* son las especies que pueden encontrarse adheridas en el ileum terminal y ciego; esto explica el valor de 9.2 Log₁₀ UFC/ml obtenido para lactobacilos en este modelo.

Cuadro 15. Cuentas microbianas del colon proximal obtenidas por Macfarlane (A), Van der Werf (B) y en este estudio (C).

Bacterias	A (Log ₁₀ UFC/g)	B (Log ₁₀ UFC/g)	C (Log ₁₀ UFC/g)
Anaerobios totales	10.4	NR	9.0
Anaerobios facultativos	8.7	NR	8.1
Bifidobacterias	10.1	9-10	8.3
Bacteroides	10.1	9-10	8.2
Clostridios	8.5	4-5	6.8
Enterococos	8.6	5-6	8.3
Coliformes	8.5	4-6	6.0
Lactobacilos	NR	5-7	9.2

NR = No reportado

5.2.4. Frecuencia de alimentación. La Figura 7 muestra el efecto de dos frecuencias de alimentación en el crecimiento microbiano durante 48 de fermentación en el modelo. Con la alimentación de una vez al día se obtuvo menor crecimiento en todos los grupos bacterianos.

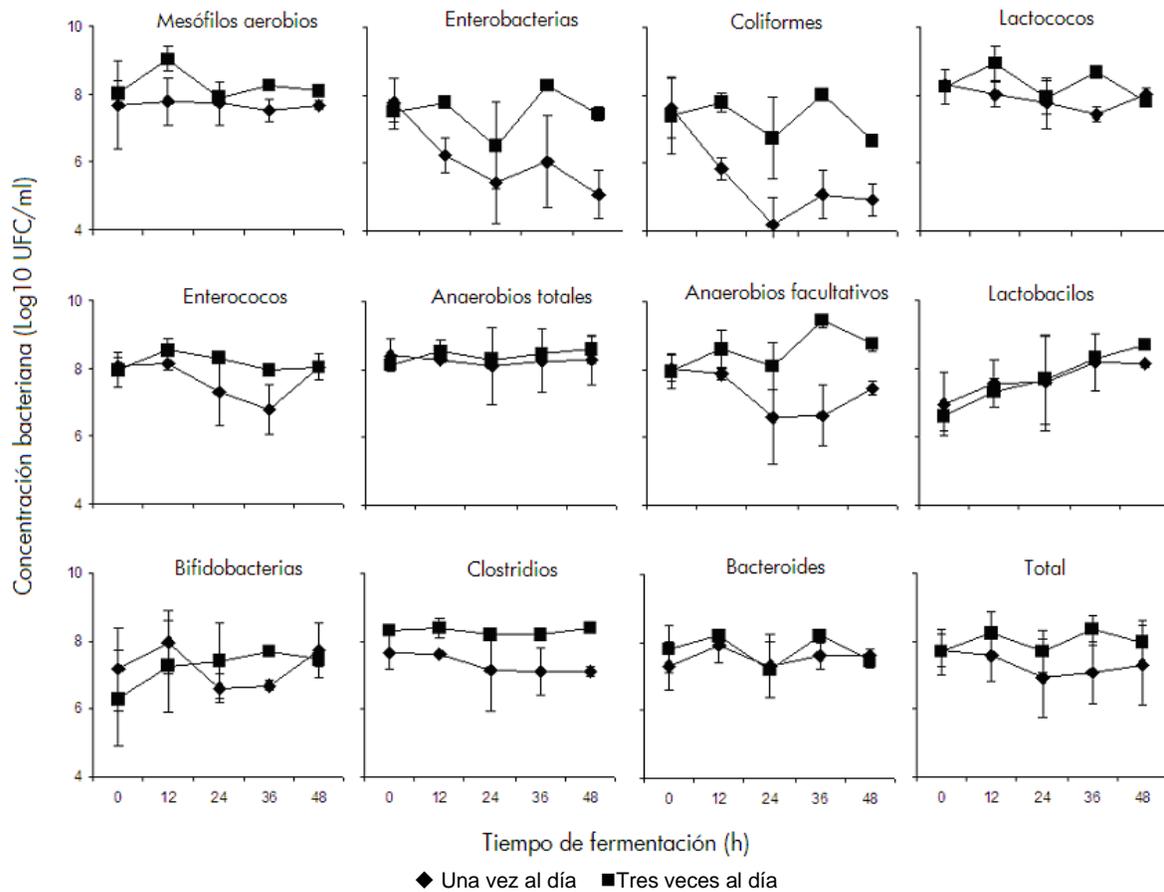


Figura 7. Efecto de la frecuencia de alimentación del modelo en la microflora.

La Figura 8 muestra la concentración de ácidos grasos de cadena corta producida durante la fermentación en el modelo, dentro y fuera de la membrana. La concentración de los ácidos acético y propiónico mostró patrones muy similares de producción; cuando el modelo se alimentó una vez, la producción de ambos ácidos fue mayor que cuando el modelo se alimentó tres veces. Sin embargo, con el ácido butírico, se presentó la mayor producción cuando el modelo se alimentó tres veces al día. La producción total de ácidos grasos de cadena corta fue mayor cuando se alimentó el modelo una vez al día (173.85 mmol/ml), que cuando se alimentó tres veces al día (117.28 mmol/ml).

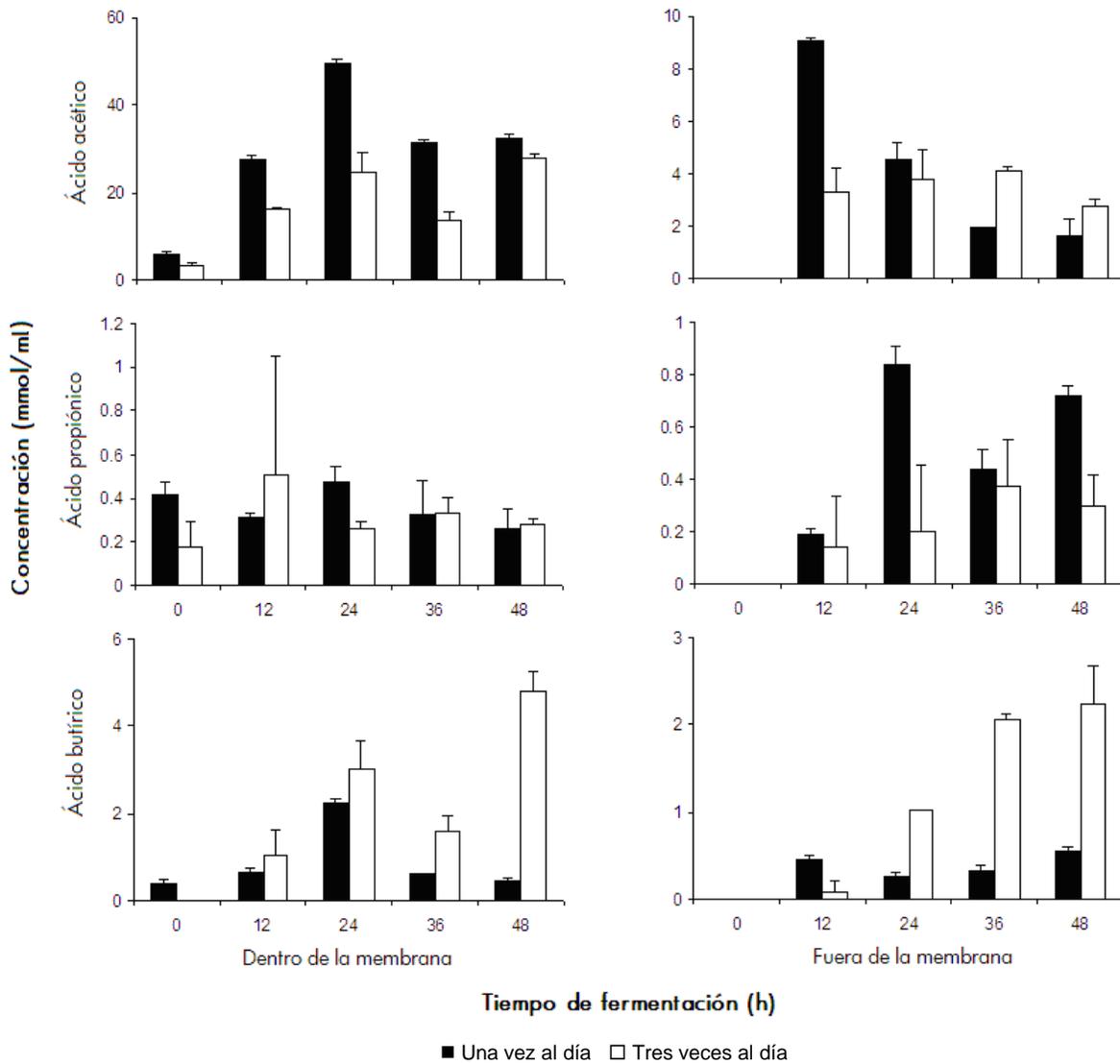


Figura 8. Concentración de AGCC en el modelo alimentado una vez y tres veces al día.

La frecuencia de la alimentación mostró una relación directa con el crecimiento microbiano, y una relación inversa en la producción de ácidos acético y propiónico. La frecuencia de la alimentación también se ha relacionado con otros aspectos fisiológicos humanos. La concentración de colesterol total y colesterol LDL (colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad) está relacionado con la frecuencia de alimentación; se ha encontrado que una alimentación al día favorece el aumento de colesterol total y el colesterol LDL en la sangre, mientras que su concentración disminuye al aumentar la frecuencia de alimentación de dos a seis veces al día (Titan *et al.*, 2001). El nivel elevado de colesterol LDL

está relacionado con enfermedad coronaria, arteriosclerosis, lesión endotelial y formación de radicales libres (Minguez, 2004). Tseng *et al.* (2000) encontraron que al aumentar la frecuencia de la alimentación a más de tres veces al día se reducen los efectos de la diabetes, sin embargo, en el caso del cáncer de colon, los resultados no fueron concluyentes. Wei *et al.* (2004) encontraron una correlación directa entre la disminución de la frecuencia de las comidas y la disminución del riesgo de cáncer en hombres, no entre mujeres; esta correlación se estableció por la cantidad de ácidos biliares en hombres con una ingesta mayor de ocho veces al día. Coates *et al.* (2002) reportaron no haber encontrado relación entre el número de veces que se come durante el día y cáncer en mujeres, mientras que en hombre, comer más de tres veces no aumentó el riesgo de contraer cáncer.

En cerdos, Réart *et al.* (1987) compararon el efecto de alimentarlos una y dos veces al día, empleando una dieta compuesta por 17.0% de proteínas, 3.92% de grasa y 6.2% de fibra cruda. El principal ácido graso volátil fue el acético, seguido del propiónico. No se observó diferencia en la concentración de ácidos grasos volátiles en los dos tipos de alimentación.

El ácido butírico y el butirato presentes en la luz del colon tras la digestión de, por ejemplo, alimentos ricos en fibra, regulan la diferenciación de las células mucosas del intestino grueso e inducen la apoptosis, que es importante para controlar la inflamación y evitar la aparición del cáncer (Martin *et al.*, 2000; Peña, 2007). En un estudio realizado por Stote *et al.* (2007) se encontró que cuando se consume alimentos una vez al día, hay un aumento significativo en el hambre, reducción en la grasa magra, aumento de la presión arterial, aumento de la concentración del colesterol total y colesterol LDL, y una disminución en las concentraciones de cortisol.

Los AGCC son producidos por los microorganismos de la flora colónica. Son producidos en el colon, se absorben fácilmente y se metabolizan en el hígado y los tejidos musculares, donde producen energía para el cuerpo humano. Las células de la mucosa colónica consumen principalmente ácido butírico, un tipo de ácido graso de cadena corta, una fuente principal de energía. Una deficiencia en ácido butírico conduce a un mal funcionamiento del colon. Los ácidos grasos de cadena corta no son simplemente fuentes de energía, sino que se logran acciones fisiológicas. Estos incluyen la mejora de la absorción de

agua y varios minerales, especialmente calcio, magnesio y hierro, y la supresión de la síntesis hepática de colesterol. El ácido butírico es un supresor del cáncer de colon, reduce la proliferación celular e induce la apoptosis en las células mutadas. El ácido butírico es muy probable que sea eficaz para la prevención de esta enfermedad mortal. La investigación en ácidos grasos de cadena corta puede aclarar las implicaciones fisiológicas de la fermentación colónica y prebióticos (Hiroshi, 2002). Los ácidos grasos de cadena corta producidos por fermentación fecal están posiblemente involucrados en la disminución de los niveles de colesterol en plasma (Hiroshi *et al.*, 1999).

5.2.5. Producción de ácidos grasos de cadena corta. La producción de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) dentro y fuera de la membrana de diálisis se muestra en la Figura 9.

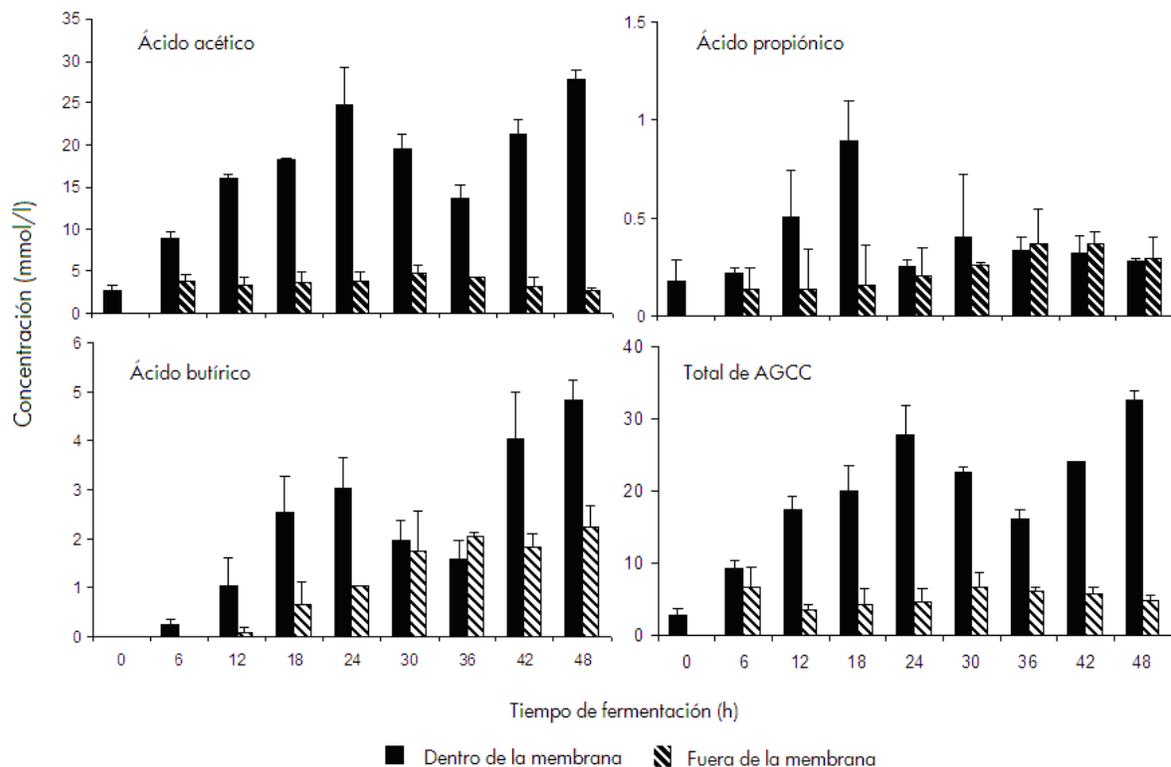


Figura 9. Producción de AGCC dentro y fuera de la membrana del modelo de colon.

En cuanto a la producción total, se obtuvo hasta 32.8 mmol en el interior de la membrana y 6.8 mmol fuera de ella; estas concentraciones difieren significativamente. La producción total de AGCC fue mayor a las 48 h de fermentación. Sin embargo, hubo un pico en la producción de AGCC total en el interior de la membrana a las 24 h, mientras que en general, la cuenta microbiana alcanzó su valor más bajo en este periodo. Si se tiene en cuenta que la variación de la cuenta microbiana se relacionó con la cantidad de sustrato, la máxima producción de AGCC parece haber ocurrido cuando la cantidad de sustratos fue más bajo, lo que significa que la mayor producción de AGCC se alcanzó durante el período más largo sin alimentación (24 y 48 h), al menos para los ácidos acético y el butírico. Además, en general, cuanto mayor es la longitud de los ácidos grasos, mayor es la concentración fuera de la membrana a lo largo de la fermentación; especialmente en el caso del ácido butírico, la proporción con el total de AGCC fue bastante superior fuera que dentro de la membrana en las etapas avanzadas de fermentación. Esto podría haberse debido a la eficacia de extracción de la solución de PEG. Es interesante observar que en el colon humano la difusión pasiva es el principal mecanismo de absorción de AGCC, la absorción aumenta con relación a la longitud de la cadena del ácido graso (Vogt y Wolever 2003); la absorción de ácido butírico fue significativamente mayor que la de ácido acético. De acuerdo a Vogt y Wolever (2003) el porcentaje de absorción de ácido acético en el colon humano es del 24%, mientras que para el ácido propiónico es el 28% y para el ácido butírico es 30%. En este trabajo, las concentraciones medias de los ácidos acético y el butírico fuera de la membrana fueron 23% y 47%, respectivamente; estos datos son similares a los valores de absorción en el colon humano.

El ácido propiónico fue el que presentó la menor producción, sobre todo al final de la fermentación, y la concentración fue mayor fuera de la membrana que dentro. En general, la absorción de este sistema que utiliza solución de PEG puede ser considerado un sistema eficaz para simular la absorción de AGCC en el colon humano.

El Cuadro 16 muestra la relación entre la producción de cada ácido y la producción total de ácidos grasos de cadena corta. Se observa que al inicio de la fermentación, el acetato fue el compuesto predominante, y que la proporción de los otros dos compuestos es muy baja. Sin embargo, después de 12 h la proporción de butirato aumentó y el acetato disminuyó. No se observaron cambios en la proporción del propionato.

Cuadro 16. Proporciones de AGCC producidos en el modelo a pH 8.00 y humedad de 90% durante 48 h a 37°C y solución de PEG a pH 9.5.

Proporción de AGCC (mmol/l)	Tiempo (h)								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Dentro									
Acético/total	0.94 ± 0.02	0.95 ± 0.01	0.91 ± 0.06	0.86 ± 0.03	0.88 ± 0.04	0.89 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.85 ± 0.01
Propiónico/total	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Butírico/total	0	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01
Fuera									
Acético/total	0	0.97 ± 0.02	0.93 ± 0.04	0.84 ± 0.08	0.75 ± 0.02	0.71 ± 0.04	0.63 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.52 ± 0.05
Propiónico/total	0	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.07	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.02
Butírico/total	0	0	0.02 ± 0.03	0.14 ± 0.05	0.21 ± 0.06	0.25 ± 0.05	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.42 ± 0.08
Total									
Acético/total	0.94 ± 0.02	0.95 ± 0.00	0.92 ± 0.04	0.85 ± 0.01	0.86 ± 0.03	0.85 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.01
Propiónico/total	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Butírico/total	0	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.13 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01

En el colon, la proporción normal de AGCC es alrededor de 60% de ácido acético, 20% de propiónico y 20% de butírico (Macfarlane y Cummings 1991). Sin embargo, la proporción molar de estos productos depende de una serie de factores, incluyendo la dieta y la microbiota (Louis *et al.*, 2007). En este trabajo, la concentración de ácido acético fue muy elevada al comienzo de la fermentación, pero su proporción tendió a disminuir al avanzar la fermentación. Por otro lado, la cantidad de ácido butírico fue no detectable cuando se inició la fermentación, pero se incrementó a lo largo del proceso y alcanzó el 18% del total de AGCC a las 48 h. El ácido propiónico se mantuvo en proporciones muy bajas todo el tiempo. Las interacciones metabólicas entre los microorganismos presentes en la microbiota intestinal son muy complejas; la producción de determinados metabolitos depende del tipo de sustrato que entra al sistema, y muchas veces, el producto formado se convierte en sustrato para el crecimiento de otro microorganismo, esto hace que la concentración e los metabolitos varíe a lo largo del proceso de fermentación (Cummings y Macfarlane, 1991).

5.3. Respuesta del modelo a la adición de inulina

Para evaluar la capacidad de respuesta inducida en la microflora, se evaluó la adición de 1.0 g de inulina en el alimento suministrado al sistema modelo, la Figura 12 muestra los resultados obtenidos. Después de 24 horas de adicionar inulina al sistema se observó un aumento en la concentración de anaerobios totales y facultativos, así como en lactobacilos y bifidobacterias, siendo estas últimas, quienes alcanzaron la mayor concentración ($9.60 \pm 0.45 \log_{10}$ UFC/ml). Aunque en la concentración de mesófilos aerobios se presentó un aumento, en coliformes y enterobacterias, hubo una disminución en la concentración. La concentración de clostridios se mantuvo igual tanto a las 24 h como a las 48 h su crecimiento no fue afectado por la adición de inulina.

La inulina es en la actualidad el prebiótico mejor conocido, y su efecto bifidogénico ha sido ampliamente estudiado (Rastall y Maitin, 2002). Al añadir 1.0 g de inulina en 100.0 g de alimento introducido en el modelo se pudo apreciar un aumento en el crecimiento tanto de bifidobacterias como de lactobacilos, así como el descenso en el crecimiento de algunas especies como las enterobacterias; lo anterior demuestra la sensibilidad del sistema modelo del colon para mostrar esos pequeños cambios que ocurren en el metabolismo de la microflora colónica ante un estímulo alimenticio como lo es la adición de inulina.

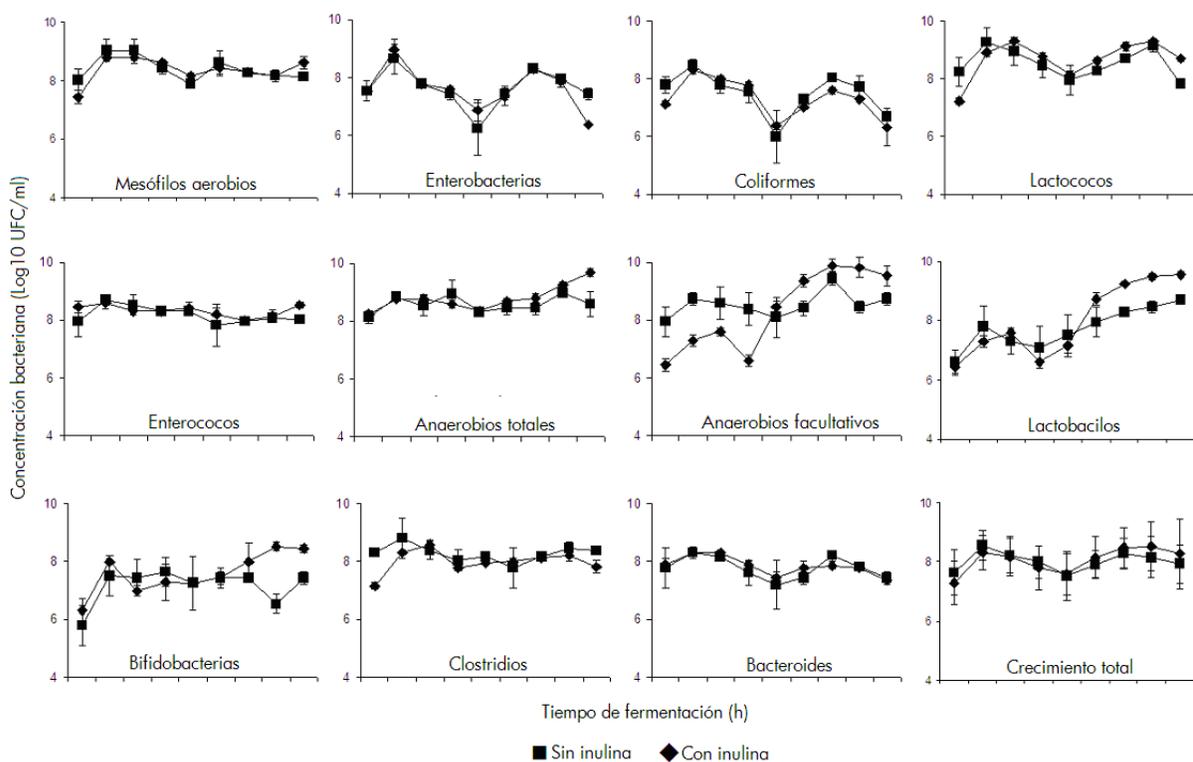


Figura 12. Crecimiento de los grupos bacterianos colónicos al adicionar inulina.

5.4. Evaluación en el modelo de almidón resistente y fibra como prebióticos

5.4.1. Almidón resistente de plátano. Con la finalidad de evaluar el efecto en la estimulación selectiva de los grupos bacterianos benéficos para el ser humano, así como la producción de ácidos grasos de cadena corta, se evaluó el efecto del almidón resistente de plátano empleando el sistema modelo del colon proximal humano. Se comparó con inulina y almidón de trigo. Se evaluaron cantidades diferentes de almidón resistente, de acuerdo al sustrato, para la harina integral de plátano, la concentración de almidón resistente fue de 27.45%, mientras que para el almidón resistente tipo II fue de 58.86%, lo que correspondió a la mayor cantidad; en el almidón resistente tipo III, la concentración de almidón resistente fue de 9.79% y en la harina de trigo de solamente 1.00%.

El Cuadro 17 muestra la caracterización fisicoquímica de los almidones de plátano y la harina integral de plátano evaluados en el modelo. La composición de los almidones

resistentes difiere en comparación con la harina integral principalmente en la cantidad de proteínas y la presencia de almidón disponible y resistente. La harina de plátano contiene valores bajos de proteína, si se compraran con la harina de trigo, ya que en esta última, se han reportado valores de proteína de 10% (Cho *et al.*, 2001). Sin embargo, la proteína presente en la harina de plátano cuadrado se encuentran por arriba de los reportados por Mota *et al.* (2000) para variedades cultivadas en Brasil, donde la proteína presenta valores entre 2.5 y 2.8%, así como los reportados por Muyonga (2001) para *Musa cavendishii* de solamente 1.51%.

El plátano cuadrado es una fuente importante de almidón, ya que entre el 70 y 80% del fruto es almidón (De la Torre, 2004; Pacheco-Delahaye y Testa, 2005) y de éste, el 55% es almidón resistente. En maíz, para lograr cantidades semejantes se ha recurrido a la mutación genética para obtener un maíz de alta amilosa, con cantidad de almidón resistente II de 48.5% (Novelosē 240®). El almidón de plátano es una fuente natural de fácil extracción.

Cuadro 17. Composición proximal y química de almidones.

Determinación	Harina	AR2	AR 3
Humedad	7.45 ± 0.28	8.80 ± 0.25	8.65 ± 0.30
Cenizas	2.44 ± 0.01	0.94 ± 0.08	0.50 ± 0.05
Proteína cruda	4.44 ± 0.40	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Extracto etéreo	0.85 ± 0.22	0.08 ± 0.01	0.42 ± 0.05
Fibra cruda	1.88 ± 0.16	0.71 ± 0.06	0.82 ± 0.03
Extracto Libre de Nitrógeno	90.39 ± 0.21	98.14 ± 0.82	98.07 ± 0.08
Almidón total	73.66 ± 1.08	95.10 ± 0.98	94.52 ± 1.85
Almidón disponible	46.21 ± 1.18	38.24 ± 1.22	84.73 ± 1.23
Almidón resistente	27.45 ± 1.28	56.86 ± 1.46	9.79 ± 0.61

La figura 13 muestra el crecimiento de las bacterias aerobias en el modelo al adicionarse 3.0 g de cada sustrato. Las bacterias aerobias forman parte importante de la microflora colónica y su crecimiento es importante para mantener el equilibrio bacteriano; sin embargo, las enterobacterias son a menudo implicadas en desórdenes intestinales debido a su acción patógena. Para cada condición de alimentación suministrada al modelo colónico se

encontró una disminución en la concentración del grupo de enterobacterias y coliformes, este efecto fue más acentuado al emplear harina de plátano integral.

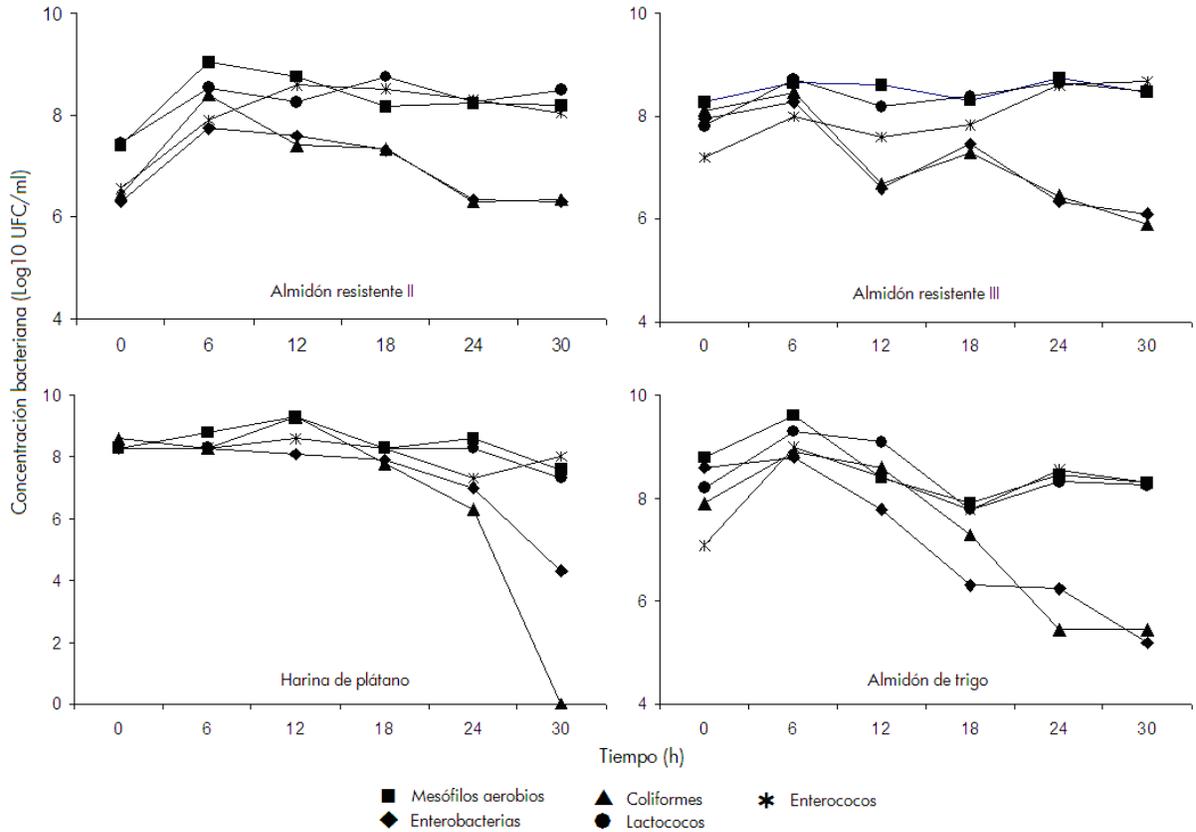


Figura 13. Crecimiento de bacterias aerobias al emplear diferentes sustratos amiláceos como aditivos en la alimentación.

Entre las bacterias anaerobias, al igual que en las aerobias, se observó un efecto de inhibición en el crecimiento del grupo bacteroides, como se observa en la Figura 14.

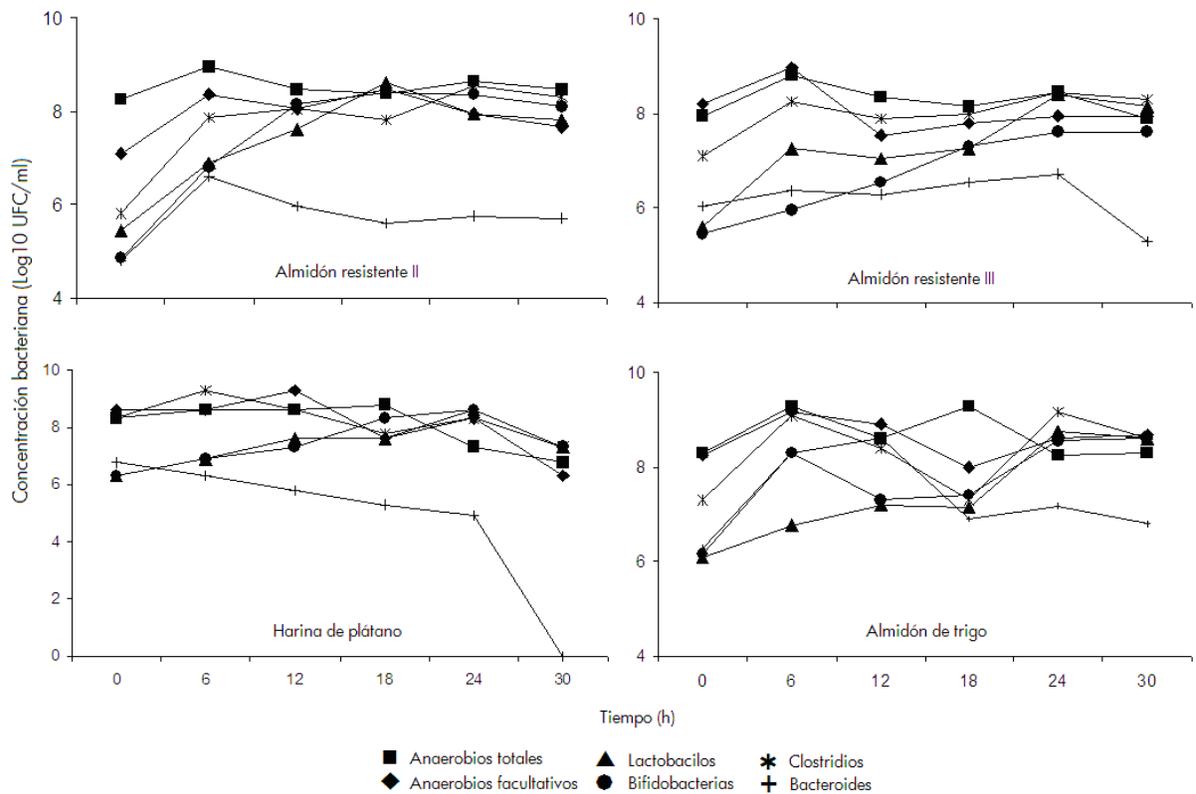


Figura 14. Crecimiento de bacterias anaerobias al emplear diferentes sustratos amiláceos como aditivos en la alimentación.

Este efecto negativo en el crecimiento probablemente estuvo asociado al aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta, lo que se reflejó en el pH obtenido durante el tiempo de fermentación. Por otra parte, en todos los sustratos evaluados se observó una estimulación en el crecimiento de las bacterias lácticas y bifidobacterias acentuado a partir de las 12 h de fermentación. Tanto las bacterias lácticas como las bifidobacterias son microorganismos cuyo crecimiento puede realizarse a niveles de pH muy bajos. Durante las 30 h de fermentación, el descenso del pH fue más pronunciado a partir de las 12 h, como se muestra en la Figura 15. En todos los sustratos amiláceos evaluados se obtuvo una tendencia similar en el comportamiento.

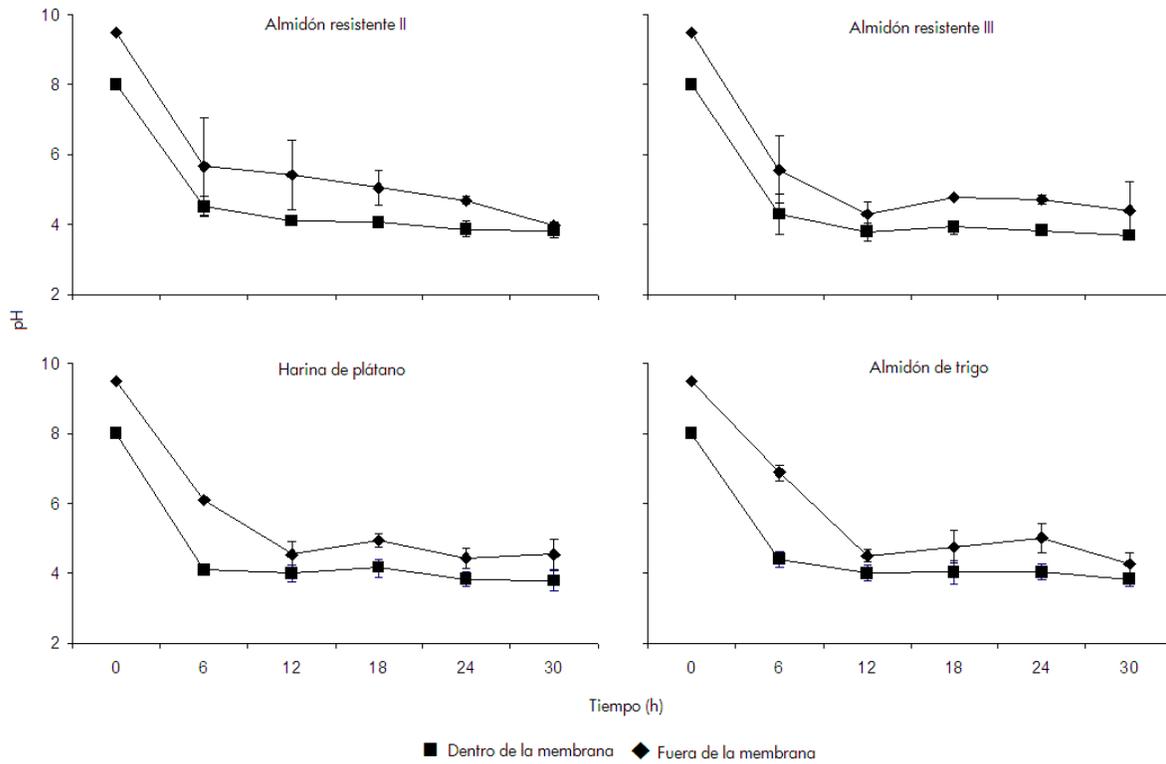


Figura 15. Valores de pH durante la fermentación del almidón resistente tipo III.

En cuanto a la producción de ácidos grasos de cadena corta, la concentración de ácido acético fue mayor en todos los sustratos, mientras que las concentraciones de propiónico y butírico se mostraron en muy pequeñas cantidades, a excepción de la harina de trigo, como se muestra en la Figura 16.

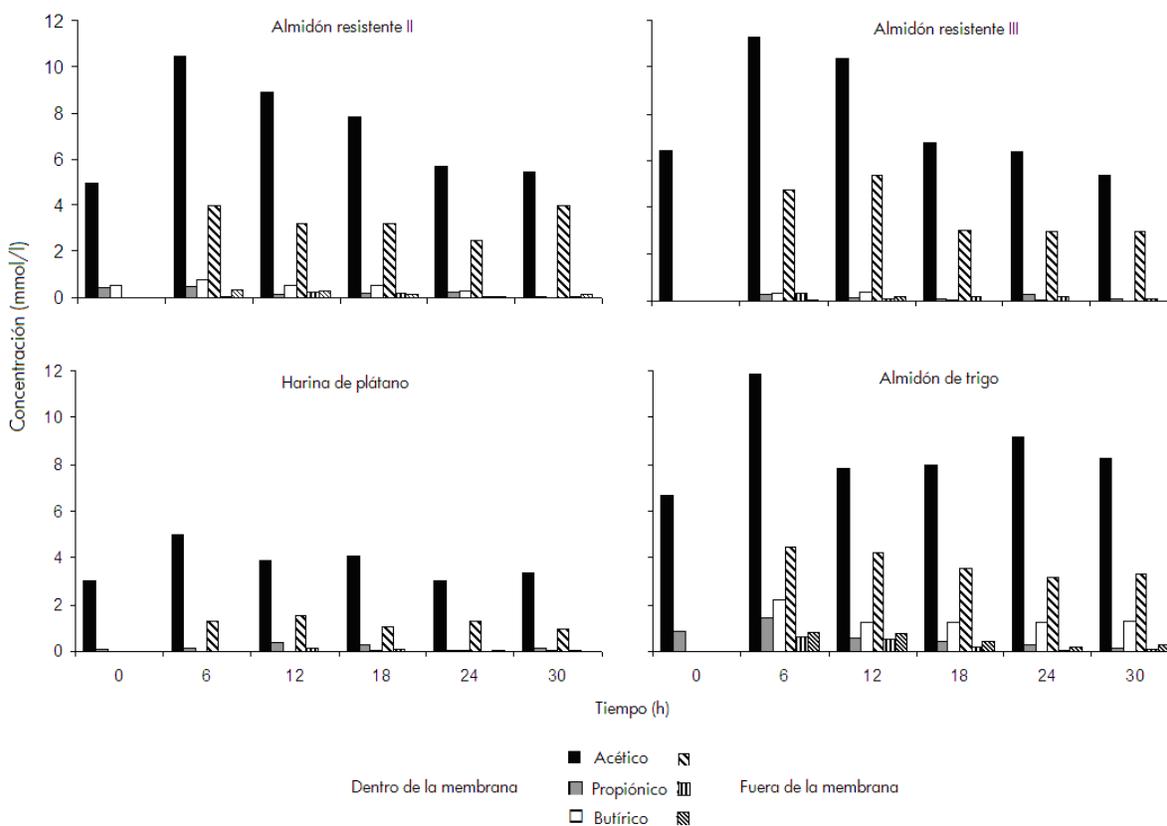


Figura 16. Producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación de almidón resistente.

Aunque la mayor producción total de ácidos grasos se obtuvo en la harina de trigo, ésta resulto ser un carbohidrato fácilmente digerible, por lo que su llegada al intestino grueso es muy poco probable, por lo que el almidón resistente de plátano constituye una buena opción en alimentación ya que se asegura que más de la mitad ingerida llegue al colon debido a su alta resistencia a la digestión.

5.4.2. Fibra dietética de naranja. La fermentación de fibra dietética constituye una fuente de energía para los grupos bacterianos que se encuentran en la región colónica. Se ha reportado el efecto benéfico del consumo de fibra en el alimento debido a la estimulación de ciertos grupos bacterianos benéficos como los lactobacilos y bifidobacterias, así como a la producción de ácidos grasos de cadena corta. El Cuadro 18 muestra la caracterización fisicoquímica de la harina y la pectina de naranja, donde se observa que el principal componente de la harina de naranja fueron los carbohidratos (79.18%) cuantificados como extracto libre de nitrógeno, seguidos por la fibra cruda ($11.27 \pm 0.10\%$) y las proteínas ($5.63 \pm$

0.14%), siendo el extracto etéreo el componente que se encontró en menor cantidad ($0.59 \pm 0.08\%$). En el aislado de pectina, tanto las proteínas, como el extracto etéreo y la fibra cruda estuvieron presentes en cantidades mínimas. En cuanto al contenido de fibra cruda y fibra dietética, en ambas el contenido fue mayor en la harina que en la pectina. En harina, tanto la fibra dietética soluble como la insoluble se encontraron en concentraciones similares; sin embargo, en la pectina, el componente que predominó fue la fibra dietética soluble.

Cuadro 18. Composición fisicoquímica de harina y pectina de naranja.

Determinación (%)	Harina	Pectina
pH	4.29 ± 0.15	2.84 ± 0.14
Humedad	8.73 ± 0.11	14.53 ± 1.58
Cenizas	3.33 ± 0.74	2.27 ± 0.29
Proteína cruda	5.63 ± 0.14	0.52 ± 0.18
Extracto etéreo	0.59 ± 0.08	0.20 ± 0.19
Fibra cruda	11.27 ± 0.10	0.93 ± 0.78
Extracto libre de nitrógeno	79.18 ± 0.22	96.08 ± 0.53
Fibra dietética total	39.52 ± 2.08	17.20 ± 2.19
Fibra dietética soluble	20.05 ± 1.71	14.62 ± 2.84
Fibra dietética insoluble	19.02 ± 1.34	2.58 ± 3.50

En cuanto al crecimiento de los diferentes grupos de la microflora del colon, como se muestra en la Figura 24, la harina de naranja integral disminuyó la cuenta de enterobacterias y coliformes, mientras que en la pectina, todos los grupos tuvieron buen crecimiento. En cuanto a los anaerobios, la estimulación de lactobacilos y bifidobacterias se observó en los dos sustratos, sin embargo, en pectina se observó una disminución en el crecimiento de bacteroides.

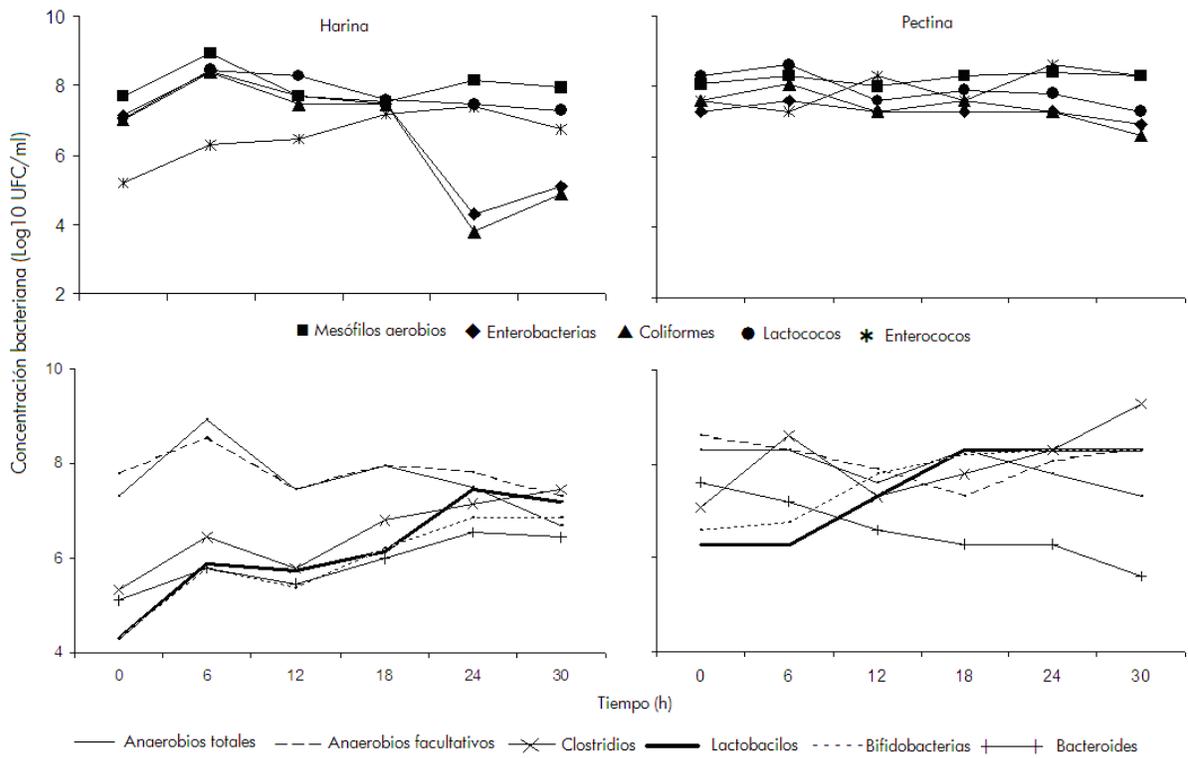


Figura 24. Crecimiento de grupos bacterianos al adicionar harina y pectina de naranja a la alimentación.

Aunque la pectina es principalmente un sustancia con un alto contenido de fibra dietética, los resultados obtenidos al evaluar harina de naranja sugieren que puede emplearse ésta última como aditivo alimentario en lugar del aislado de pectina, ya que la estimulación de la flora es mucho más selectiva y no se obtuvo diferencia entre la producción de ácidos grasos de cadena corta. Por otra parte, durante el aislamiento de pectina solo es aprovechable el 10% del total de la harina de naranja. La producción de ácidos grasos de cadena corta en ambos sustratos estuvo formada principalmente por ácido acético.

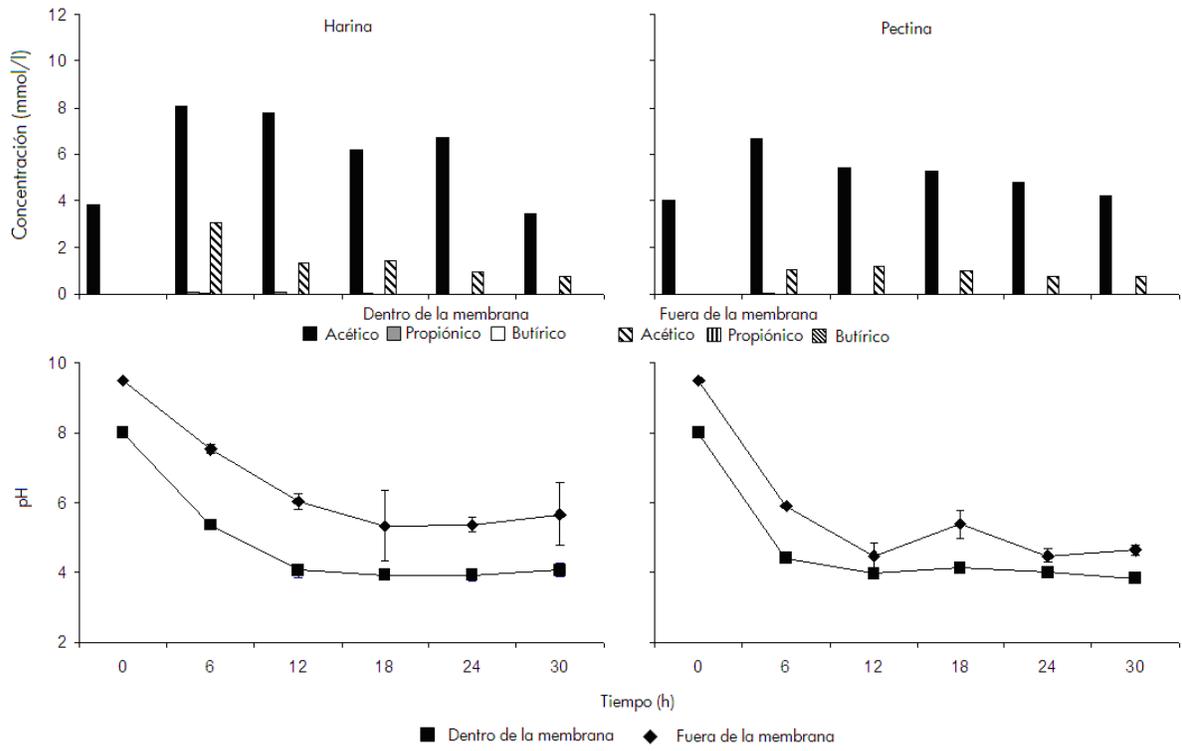


Figura 25. Concentración de AGCC y valores de pH en harina y pectina de naranja

6. CONCLUSIONES

Se logró la propagación de algunos grupos bacterianos de la microbiota fecal en caldos de cultivo comerciales (BHI y TSB) con una concentración similar a la encontrada en solución fecal. La propagación mejoró las condiciones de manejo y transporte y se eliminó la interferencia por sustancias desconocidas. Además, el uso de glicerol permitió mantener la concentración de la biomasa fecal durante 6 meses en congelación.

Se diseñó y evaluó un modelo que imita algunas condiciones del colon proximal humano. Se logró la operación continua del modelo durante 48 h y mostró el efecto del sustrato alimenticio para mantener la microflora. El sistema de absorción reprodujo las condiciones del colon proximal en cuanto a la absorción de ácidos grasos de cadena corta. Este modelo puede ser usado para estudiar la microflora colónica, así como para evaluar cambios inducidos por componentes de la dieta como los prebióticos.

Se obtuvo la caracterización fisicoquímica de almidón resistente de plátano y fibra dietética de naranja. El almidón de plátano *Musa balbisiana* Colla contiene más de la mitad de almidón resistente a la digestión. La harina de naranja contiene alrededor de 40% de fibra dietética, de la cual, la mitad corresponde a fibra dietética soluble.

El almidón resistente de plátano y la fibra dietética de naranja provocaron una disminución en la concentración de enterobacterias y un aumento en lactobacilos y bifidobacterias al ser adicionadas en la alimentación del modelo de colon. La fibra de naranja y pectina sólo estimularon la formación de ácido acético, mientras que con los almidones se obtuvo acético, propiónico y butírico.

REFERENCIAS

- Aalkjær, C., 2002. Short chained fatty acids and the colon: how do they cause vasodilatation?. *Journal of Physiology*. 538.3:674.
- Abreu, L., 1981. *Fundamentos de Gastroenterología*. Tercera edición. Francisco Méndez Cervantes. México. p 23-36.
- Aggett, J., Agostoni C., Axelsson I., Edwards C., Goulet O., Hermell O., 2003. Non-digestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 36:29-37.
- Ahmed, R., Segal I. y Hassan H., 2000. Fermentation of dietary starch in humans. *American Journal of Gastroenterology*. 95:1017-1020.
- Alcamo, E., 2001. *Fundamentals of Microbiology*. Jones and Bartlett Publishers. Boston. p 114.
- Andersson, H., Asp N., Bruce A., 2001. Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies. *Scandinavian Journal of Food & Nutrition*. 45:48-75.
- AACC, American Association of Cereal Chemists, 1990. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. American Association of Cereal Chemists. Minesota.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 1997. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, 17 a. ed. William Horwitz Editor. Washington, D.C.
- Balcázar-Muñoz, R., Martínez-Abundis E. y González-Ortiz M., 2003. Efecto de la administración oral de inulina sobre el perfil de lípidos y la sensibilidad a la insulina en individuos con obesidad y dislipidemia. *Revista Médica Chilena*. 131:597-604.
- Bello-Pérez, L., Agama A., Sánchez H. y Pacheco L., 1999. Isolation and partial characterization of banana starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(3):854-857.
- Bello, L., Sáyago A., Villagomez M. y Montiel S., 2000. Almidón de plátano y calidad sensorial de dos tipos de galletas. *Agrociencia*. 34:553-560.
- Berens, H., 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* sp. *Letters Applied Microbiology*. 11(3):155-157.
- Berens, H., 1991. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(8):2418-2419.

- Bingham, S., 2000. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochemical Society Transaction*. 28(2):12-16.
- Bird, A., 1999. Prebiotics: A role for dietary fibre and resistant starch?. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 8(Suppl.):532-536.
- Bird, A., Brown I. y Topping D., 2000. Starches, resistant starches, the gut microflora and human health. *Current Issues Intestinal Microbiology*. 1(1):25-37.
- Blasco, C. y Soriano J., 2006. *Nutrición Básica Humana*. Universitat de València. España. pp 421.
- Blaut, M., 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*. 41(Suplemento 1):111-116.
- Boehm G., Jelinek J., Stahl B., Van Laere K., Knol J., Fanaro S., 2004. Prebiotics in infant formulas. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 38(Suplemento 2):S76-S79.
- Bollard, J., Vanderwee M., Smith G., Tasman-Jones C., Gavin J. y Lee S., 2005. Preservation of mucus *in situ* in rat colon. *Digestive Diseases and Sciences*. 31(12):1338-1344.
- Bongers, A. y van den Heuvel E., 2003. Compuestos prebióticos y biodisponibilidad de minerales y oligoelementos. *Gastroenterología y Hepatología*. 26:50-63.
- Booher, S., Cornick N. y Moon H., 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. *Veterinary Microbiology* 89:69–81.
- Bornet, F., 1994. Undigestible sugars in food products. *American Journal of Clinical Nutrition*. 59(suplemento):763S-769S.
- Boscá, M., Bellver M. y Ramos M., 2002. Caracterización y estudio de solubilidad de mezclas binarias de flunarizina/polietilenglicol 4000. *Ars Pharmaceutica*. 43(1-2):73-82.
- Brück, W., Graverholt G. y Gibson G., 2003. A two-stage continuous cultura system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed cultures of human gut bacteria challenged with enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* serotype *Typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*. 95(1):44-53.
- Buddington, K., Donahoo J. y Buddington R., 2002. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *Journal of Nutrition*. 132:472-477.
- Burns, A. y Rowland I., 2003. Prebióticos y probióticos en la prevención del cáncer de colon. *Gastroenterología y Hepatología*. 26:73-84.
- Cagigas, R. y Blanco A., 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición*. 16(1):63-68.

- Camejo, A., Ferrer A., Ferrer B., Peña J. y Cedeño M., 1996. Extracción y caracterización de pectina en toronjas de la región Zuliana. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 13:647-652.
- Casellas, F. y Malagelada J., 2003. Applicability of short hydrogen breath test for screening of lactose malabsorption. *Digestive Diseases and Sciences*. 48(7):1333-1338.
- Coates, A., Potter J., Edwards S. y Slattery M., 2002. Eating frequency and the risk of colon cancer. *Nutrition and Cancer*. 43(2):121-6.
- Cook, I., Furukawua Y., Panagopoulos V., Collins P. y Dent J., 2000. Relationships between spatial patterns of colonic pressure and individual movements of content. *American Journal of Physiology. Gastrointest. Liver Physiology* 278:G329-G341.
- Coppo, J., Coppo N., Revidatti M., Capellari A., Navamuel J. y Fioranelli S., 2002. Efectos de la suplementación con citrus sobre las ganancias de peso y proteínas plasmáticas de vacas de invernada. *Analecta Veterinaria*. 22(2):15-21.
- Corona, A., Jiménez R., 2004. Comparación de dos métodos de siembra para el recuento de microorganismos en muestras con alta concentración microbiana. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*. 40:3-7.
- Crespo, M., Abarca M. y Cabañes F., 2000. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(10):3872-3875.
- Croghan, M., 2002. Resistant starch as functional ingredient in food system. *Nafas Science*. 9:35-39.
- Cummings, H., 1997. *The large intestine in nutrition and disease*. Institut Danone. Bruxellas. pp 48.
- Cummings, H., 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal Clinical Nutrition*. 73(suppl):415S-420S.
- Cummings, J. y Macfarlane G., 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*. 70:443-459.
- Cummings, H., Macfarlane G. y Englyst H., 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(Suplemento 2):415S-420S.
- Cheng, Y., Tsai M., y Tseng K. 1996. Effect of amylose content on the rheological property of rice starch. *Cereal Chemistry*, 73(4): 415-420.
- Cheng-Tang, W., Zhan-Liang L., y De-Xin X., 1998. Relationship between enteric microecologic dysbiosis and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis. *World Journal Gastroenterology*. 4(3):242-245.

- Christensen, J., 1985. The response of the colon to eating. *American Journal Clinical Nutrition*. 42(5):1025-1032.
- De Boever, P., Deplancke B. y Verstraete W., 2000. Fermentation by microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved y supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition*. 130:2599-2606.
- De la Torre, 2004. Extracción y caracterización fisicoquímica y funcional del almidón de plátano cuadrado (*Musa balbisiana* Colla). Tesis de Maestría en ciencia y tecnología de alimentos. FIQ-UADY. México. pp 35.
- Delzenne, N. y Kok N., 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(Suplemento 2):456S- 458S.
- Delzenne, N. y Williams C., 2002. Prebiotics and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*. 13:61-67.
- Dixon, F., 1977. Sugar cane for beef production: Derinded sugar cane and chopped cane compared with hay and citrus pulp. *Tropical Animal Production*. 3(2):104-108.
- Domínguez, P., 1995. Pulpa de cítricos en la alimentación de cerdos. *Revista Computarizada de Producción Porcina*. 2(2). [En línea]: Venezuela. <<http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/rcpp.htm>> [Consulta: 10/12/2002].
- Duncan, S., Scott K., Ramsay A., Harmsen H., Welling G., Stewart C. y Flint H., 2003. Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(2):1136-1142.
- Eliasson, A. y Gudmundson M., 1996. Starch: physicochemical and functional aspects. In: A. C. Eliasson, *Carbohydrates in Foods*. Marcel Dekker New York. pp. 431–504.
- Englyst, N. y Cummings H., 1986. Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*. 44:42-50.
- Englyst, H., Kingman, S. y Cummings H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*. 46 (2): 33-50.
- Escalante, 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.
- Escudero, E. y González P., 2006. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*. 21 (Supl. 2) 61-72.

- Escurero, B., Sánchez J., Borrás S. y Serrat J., 1995. Estructura y función del cuerpo humano. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. p 296.
- Evenepoel, P., Claus D., Geypens B., Hiele M., Geboes K., Rutgeerts P. y Ghoois Y., 1999. Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *American Journal of Physiology* 277(Gastrointestinal Liver Physiology 40):G935-G943.
- Feder, I., Nietfeld J., Galland J., Yearly T., Sargeant J., Oberst R., Tamplin M. y Luchansky J., 2001. Comparison of cultivation and PCR-Hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(7):2477-2484.
- Figuerola, J., Chi E., Cervantes M. y Domínguez I., 2006. Functional foods for weanling pigs. *Veterinaria México*. 37(1):117-136.
- Fitch, M. y Fleming S., 1999. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa *in vivo*. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. 277:G31-G40.
- Forero, E., Cardona H., Reyes G., Abello H., Rosas M. y Sánchez C., 2005. Preparación intestinal para colonoscopia; comparación entre polietilenglicol y manitol: Estudio de costo efectividad, doble ciego aleatorizado. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 20(4):60-71.
- Forero-Gómez, J. y Vera-Cala L., 2005. Efectividad del uso de un probiótico multiespecie en la prevención de enterocolitis necrotizante en recién nacidos pretérmino. *MedUNAB*. 8(1):5-10.
- Fuentes, X., Castiñeiras M. y Queraltó J., 1999. *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*, Volumen II. Segunda edición. Reverté. pp 531.
- Furrie, E., Macfarlane S., Kennedy A., Cummings J., Walsh S., O'Neill D., 2005. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomized controlled pilot trial. *Gut*. 54:242-9.
- García, R., 1990. *Alimentación Humana*. Mundi-Prensa. Madrid. pp 243-244.
- García, P., 2000. *Apuntes sobre la fibra*. Novartis. Barcelona, España. p 7.
- García, P., Bretón I., Cuerda C. y Cambor M., 2002. Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*. 17(Sup. 2):11-16.
- García, P. y Velasco C., 2007. Evolución en el conocimiento de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*. 22(Suplemento 2):20-25.

- García, O., Infante R. y Rivera C., 2008. Hacia una definición de fibra alimentaria. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 21(1):25-30.
- Gerdes, S., 2005. Synbiotic synergy of pro-and prebiotics. *Food Product Design*. 1-8.
- Gibson, G., Probert H., Van Loo J., Rastall R. y Roberfroid M., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17:259-75.
- Gimeno, C., 2004. Alimentos prebióticos y probióticos. *Offarm*. 23:90-98.
- Gómez, C., de Cos B. e Iglesias R., 2002. Fibra y Nutrición Enteral. *Nutrición Hospitalaria*. 17(Sup. 2):30-40.
- Goñi I., 1999. Prebióticos en nuevos alimentos. *Nutrición y dietas*. 1(5).
- Goñi I., García D., Mañas E. y Saura-Calixto F., 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and products. *Food Chemistry*. 56(4):445-449.
- Goñi I., García A. y Saura F., 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*. 17:427-437.
- Guarner, F., 2002. El colon como órgano: Hábitat de la flora bacteriana. *Nutrición Hospitalaria*. 17(Sup. 2):7-10.
- Guarner, F. y Malagelada J., 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 361(9356):512-519.
- Guérin-Danan, C., Andrieux C. y Szyllit O., 1999. Storage of intestinal bacteria in samples frozen with glycerol. *Microbial Ecology in Health and disease*. 11(3):180-182.
- Haubrich, W., 1982. Anatomía del colon. J. Edward Berk. *Bockus Gastroenterología*. Tomo IV Intestino (parte 2): Enfermedad crónica del intestino. Colon. Salvat Editores S. A. Barcelona. pp 2611-2636.
- He, L., Li X., Luo H., Rong H. y Cai J., 2007. Possible mechanism about the regulation of glucose on proliferation inhibition and apoptosis of colon cancer cells induced by sodium butyrate. *World Journal of Gastroenterology*. 13(29):4015-4018.
- Herdt, T., 1981. *Fisiología Gastrointestinal y Metabolismo*. CECSA. México. p 386.
- Herman, D., Mills A. y McGuire H., 1997. *Gastroenterología*. McGraw-Hill, Interamericana. México. 1997. p. 115.
- Hiroshi, H., 2002. Physiological effects of short-chain fatty acid produced from prebiotics in the colon. *Bioscience and Microflora*. 21(1):35-42.

- Hiroshi, H., Satoko H., Yoritaka A. y Shuhachi K., 1999. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *The Journal of Nutrition*. 129:942–948.
- Holma, R., Juvonen R., Asmawi M., Vapaatalo H. y Korpela R., 2002. Galacto-oligosaccharides stimulate the growth of bifidobacteria but to attenuate inflammation in experimental colitis in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 37(9):1042-1047.
- Hooper, V., Midtvedt T. y Gordon J., 2002. How hostmicrobial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*. 22:283-307.
- Inagaki, A. y Sakata T., 2001. Fermentation of oligosaccharides and influences of fermentation products. *Advanced Dietary Fibre Technology*. Barry V. McCleary and Leon Prosky. London. p. 197.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2003. Indicadores del sector alimentario. Avance de la cosecha de cultivos perennes seleccionados según año agrícola 2003. [En línea]: <http://www.inegi.gob.mx/estadística/espanol/economia/biosa/bio_09.html> [Consulta: 01/03/2003].
- INIBAP, International Network for Improvement of Banana and Plantain, 2001. Diversidad de los bananos. Red Internacional para el mejoramiento del banano y el plátano. [En línea]: <http://www.inibap.org/publications/inibap-factsheets_spa/diversidad.pdf> [Consulta: 05/07/2002].
- Jay, J., 2000. *Modern Food Microbiology*. Sexta edición. Aspen Editores. Gaithersburg, Maryland. p 374.
- Jenkins, D. y Kendall C., 2000. Resistant starches. *Current Opinion in Gastroenterology*. 16:178-183.
- Jenkins, D., Vuksan V., Kendall, C., Wursch P., Jeffcoat R., Waring S., 1998. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *Journal of the American College of Nutrition*. 17(6):609-616.
- Jie, Z., Bang-Yao L., Ming-Jie X., Hai-Wei L., Zu-Kang Z., Ting- Song W. y Craig S., 2000. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in chinese people. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72:1503-1509.
- Jiménez-Guzmán, J. y García-Garibay M., 2006. Propiedades nutracéuticas de las proteínas del suero de leche. *Carnilac Industrial*. Octubre-Noviembre. 22-27.
- Kaplan, H. y Hutkins W., 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(6):2682-2684.

- Karppinen, S., Liukkonen K., Aura A., Forssell P., y Poutanen K., 2000. *In vitro* fermentation of polysaccharides of rye, wheat, and oat brans and inulin by human fecal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(10):1469-1476.
- Kaur, N. y Gupta A., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*. 27:703-714.
- Kim, D., Kim D., Lee D., Kim K. y Kim C., 2000. Physicochemical characterization of pectin extracted from cheju mandarin (*Citrus unshiu*) peels with citric acid. *Food Science and Biotechnology*. 9(2):95-98.
- Kolida, S., Tuohy K. y Gibson G., Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87(Suplemento 2):S193-S197.
- Kunzelmann, K. y Mall M., 2002. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological Reviews*. 82:245-289.
- Ku V., Nazar B. y Alfaro R., 1993. Utilización de pulpa deshidratada de cítricos en la alimentación de los rumiantes. *Revista Biotam*. 5(1):11-15.
- Langkilde, A., Champ M. y Andersson H., 2002. Effects of high-resistant-starch banana flour (RS₂) on *in vitro* fermentation and the small-bowel excretion of energy, nutrients, and sterols: an ileostomy study. *American Journal Clinical Nutrition*. 75:104-111.
- Langlands, S., Hopkins M., Coleman N. y Cummings H., 2004. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*. 53:1610-1616.
- Lederman, E., Crum N. y Wallace M., 2004. Outbreak of *Clostridium perfringens* food-borne illness associated with a mardi gras celebration. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 12(3):154-157.
- Lehman, U., Jacobasch G. y Schmiedel D., 2002. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 5236-5240.
- Lenoir-Wijnkoop, I. y Hopkins M., 2003. The intestinal microflora. Understanding the symbiosis. John Libbey Eurotext. Montrouge, France. p. 8.
- Leyán, V., Pesutic D., Schuring G., Wittwer F., Contreras P. y Kruze J., 2005. Suplementación con selenio en vaquillas: Efecto sobre la respuesta inmune a las vacunas *Brucella abortus* cepa RB51 y toxoide tetánico. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 37(2):105-110.
- Liljeberg, H., Grandfeldt, Y., Akeberg, A. y Bjorck, I. 1996. RS content in relation to glycaemic response to processed cereal products. Simposio de Carbohidratos. Quito, Ecuador del 8-10 de mayo de 1996. Escuela Politécnica Nacional. pp 219-227.

- Ling, W., 1995. Diet and colonic microflora interaction in colorectal cancer. *Nutrition Reviews*. 15: 439-454.
- Louis, P., Scott K., Duncan S. y Flint H., 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology*. 102:1197-1208.
- Macías, A., Herrera L., Muñoz J. y Medina H., 2002. *Escherichia coli* fecal resistente a antibióticos en niños sanos, ¿Inducción por uso de antibióticos?. *Revista de Investigación Clínica*. 54(2):108-112.
- Macfarlane, G. y Cummings H., 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*. 70(6):443-459.
- Macfarlane, G., Macfarlane S. y Gibson G., 1998a. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigation the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*. 35:180-187.
- Macfarlane, S., Quigley M., Hopkins M., Newton D. y Macfarlane G., 1998b. Polysaccharide degradation by human intestinal bacteria during growth under multi-substrate limiting conditions in a three-stage continuous culture system. *FEMS Microbiology Ecology*. 26:231-243.
- Magallanes, C., Córdova C. y Orozco R., 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología* 10(2):125-132.
- Marteau, P., Pochart P., Doré J., Béra-Maillet C., Bernalier A. y Corthier G., 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10):4939-4942.
- Marti, A., Moreno J. y Martínez J., 2003. Efecto de los prebióticos en el metabolismo lipídico. *Nutrición Hospitalaria*. 18:181-188.
- Martin, L., Dumon H. y Champ M., 1998. Production of short-chain fatty acids from resistant starch in a pig model. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77:71-80.
- Martin, L., Dumon H., Lecannu G. y Champ M., 2000. Potato and high-amylose maize starches are not equivalent producers of butyrate for the colonic mucosa. *British Journal of Nutrition*. 84:689-696.
- Martínez, P., Mayorga L., Ponce T., Roldán A., Barranco E., González R. y Azaola A., 2008. Efecto de los fructooligosacáridos en la población bacteriana fecal de un neonato, crecida en cultivo por lote. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 39(1):32-37.
- Martínez-Costa, C., 2006. Efectos funcionales de los alimentos. *Anales de Pediatría*. 4:4-11.

- Mazur, A., Mohlenkamp M., Hiler G., Wilkins T., y Van Tassell R., 1993. Digestibility of selected carbohydrates by anaerobic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(11):1925-1930.
- Metges, C., 2000. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *Journal of Nutrition*. 130(Sup.):1857S-1864S.
- Meyer, D. y Tunland B., 2001. Non-digestible oligosaccharides and polysaccharides: Their physiological effects and health implications. In advanced dietary fibre technology. Barry V. Mcleary and Leon Prosky. Great Britain. p 259.
- Minguez, I., 2004. Cifras meta-óptimas de colesterol LDL en la prevención secundaria. ¿Las conocemos? ¿Las podemos alcanzar?. *Archivos de Cardiología de México*. 74(Supl. 2):S369-S374.
- Milo, O., 2002. Improving the gut feeling. *Nutraceuticals & functional foods*. *Food Technology*. 56(10):67-70.
- Mishkin, D., Sablauskas L., Yalovsky M. y Mishkin S., 1997. Fructose and sorbitol malabsorption in ambulatory patients with functional dyspepsia. Comparison with lactose maldigestion/malabsorption. *Digestive Diseases and Sciences*. 42(12):2591-2598.
- Miyake, Y., Yamamoto K. y Osawa T., 1997. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) by human intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:3738-3742.
- Molina, M. y Martín I., 2007. La fibra dietética procesada como alimento funcional. *Offarm*. 26:70-77.
- Montaldo, M., Rodríguez C., Díaz E. y Castro J., 2001. Alteraciones ultraestructurales en la mucosa del colon de ratas tratadas con Nifurtimox. *Medicina*. 61(1):67-72.
- Montijo, E., Bacarreza D., Díaz S., Cervantes R., Mata N., Zárate F., García M., López L., Ramírez J., 2008. Utilidad de los probióticos en pediatría. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 22(85):24-31.
- Moro, G., Mosca F., Miniello V., Fanaro S., Jelinek J., Stahl B., 2003. Effects of a new mixture of prebiotics on faecal flora and stools in term infants. *Acta Paediatrica*. 441(Suplemento):S77-S79.
- Mota da, R., Lajolo M., Ciacco C. y Cordenunsi B., 2000. Composition and functional properties of banana flour from different varieties. *Starch*. 52(2-3):63-68.
- Murata, T., 2006. Effects of bismuth contamination on the growth and activity of soil microorganisms using thiols as model compounds. *Journal of Environmental Science and Health*. 41(2):161-172.

- Murphy, O., 2001. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition*. 85(Suplemento 1):S47-S53.
- Murray, P., Rosenthal K. y Pfaller M., 2005. *Medical Microbiology*. Elsevier. España. p 195.
- Muyonga, J., 2001. Predehydration steaming changes physicochemical properties of unripe banana flour. *Journal of Food Processing and Preservation*. 25:35-47.
- Oku, T. y Nakamura S., 2002. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. *Pure and Applied Chemistry*. 74(7): 1253-1261.
- Olano, A. y Del Castillo M., 2005. Carbohidratos prebióticos. *Alimentación Nutrición y Salud*. 12:82-90.
- Olano-Martín, E., Mountzouris C., Gibson G., y Rastall R., 2000. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*. 83:247-255.
- Oliveros, L. y Moreno J., 2006. Prebióticos en fórmulas infantiles. *Anales de Pediatría*. 4:20-29.
- Olveira, G. y González-Molero I., 2007. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición Hospitalaria*. 22:26-34.
- Ortuño, R., 2006. Aplicaciones clínicas de los probióticos, prebióticos y simbióticos. *Carta Gastroenterológica*. 14(1):21-28.
- Ostertag, C. 1996. El almidón: producción y mercados mundiales. *Memorias de la Conferencia Internacional Almidón propiedades Físico-Químicas, Funcionales, Nutricionales y Usos*. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. pp. 229-260.
- Ouwehand, A., Isolauri E. y Salminen S., 2002. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *European Journal of Nutrition*. 41(Sup 1):I32-I37.
- Pácha, J., 2000. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiological Reviews*. 80(4):1633-1667.
- Pacheco-Delahaye E. y Testa G., 2005. Evaluación nutricional, física y sensorial de panes de trigo y plátano verde. *Interciencia*. 30(5):300-305.
- Pavón, P. y Guillán B., 2005. Alimentos funcionales. Papel de los prebióticos en nutrición pediátrica. *Anales de Pediatría*. 3:24-33.
- Percival, M., 1997. Intestinal health. *Applied Nutritional Science Reports*. 5(5):1-5.

- Pérez, B., Lugo C., y Mata R., 1988. Nota sobre el uso de la harina de cítricos en dietas para pollos barrilleros. *Agronomía Tropical*. 26(3):261-268.
- Peña, A., 2007. Flora intestinal, probióticos, prebióticos, simbióticos y alimentos novedosos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 99(11):653-658.
- Playne, M., Bennett L. y Smithers G., 2003. Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*. 58:242-264.
- Priebe, M., Vonk R., Sun X., He T., Harmsen H. y Welling G., 2002. The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *European Journal of Nutrition*. 41(Supl 1):I2-I10.
- Probert, H., Apajalahti J., Rautonen N., Stowell J. y Gibson G., 2004. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(8):4505-4511.
- Prosky, L., Asp N., Schweizer T., DeVries J. y Furda I. 1998. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 71: 1017-1023.
- Proxy, L., 2001. What is dietary fibre? A new look at the definition. *Advanced dietary fibre technology*. Barry V McCleary and Leon Prosky. London. p 69.
- Quijano, E., 1995. Extracción de pectina a partir de residuos de la extracción de jugo de naranja. Tesis de la Facultad de Química de la UADY. México.
- Quiroga, M., Otero W., Caminos J. y Gómez M., 2007. Colitis por desviación. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 22(2):126-130.
- Rabbani, G., Teka T., Zaman B., 2001. Clinical studies in persistent diarrhea: dietary management with green banana or pectin in Bangladeshi children. *Gastroenterology*. 121:554-560.
- Ranhotra, S., Gelroth A. y Glaser K., 1996. Effect of resistant starch on blood and liver lipids in hamsters. *Cereal Chemistry*. 73(2):176-178.
- Rao, V., 2001. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research*. 21:843-848.
- Rastall, R. y Maitin V., 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Food Biotechnology*. 13:490-496.
- Rautonen, N., Mkiuokko H., Nurmi J. y Stowell J., 2005. Simulation techniques of colonic fermentation and intestinal epithelial function for studying prebiotics. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*. 210(10).

- Rérat, A., Fiszlewicz M., Giusi A. y Vaugelade P., 1987. Influence of meal frequency on postprandial variations in the production and absorption of volatile fatty acids in the digestive tract of conscious pigs. *Journal of Animal Science*. 64:448-456.
- Riverón, C., 1999. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Revista Cubana de Pediatría*. 71(2):86-115.
- Rigo, J., Pielman C., Studzinski F., Knol J., Bindels J., 2001. Clinical evaluation in term infants of a new formula based on prebiotics, β -palmitate and hydrolyzed proteins. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 32:402.
- Roberfroid, M., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition*. 71(suplemento):1682S-7S.
- Roberfroid, M., 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(suplemento):406S-409S.
- Roberfroid, M., 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87(Suplemento 2):S139-S143.
- Roberfroid, M., 2005. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*. 93(Suplemento 1):S13-25.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*. 37(3) Suppl 2:830S-837S.
- Roberfroid, M. y Gibson G., 2002. Nutritional health benefits of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87(Suplemento 2):S301-S311.
- Roberfroid, M., y Slavin J., 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40:461-480.
- Ros, E., 2003. Prebióticos y probióticos en la regulación del metabolismo de los lípidos. *Gastroenterología y Hepatología*. 26:31-36.
- Rossi, M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni, S. y Matteuzzi D., 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by *Bifidobacteria*: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10):6150-6158.
- Rubio, M., 2002. Implicaciones de la fibra en distintas patologías. *Nutrición Hospitalaria*. 17(Sup. 2):17-29.
- Rubio, J., 2005. Manual para la formación de nivel superior en prevención de riesgos laborales. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. p 420.

- Rustgi A., Lichtenstein G. y Wu G., 2005. Los requisitos en Gastroenterología. Intestino grueso y delgado. Volumen 2. Elsevier. España. pp 309.
- Rycroft, C., Jones M., Gibson G. y Rastall R., 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 81(5):561-564.
- Saavedra, J. y Tschernia A., 2002. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *British Journal of Nutrition*. 87(Suplemento 2):S241-S246.
- Salas-Salvadó, J., Bonada A., Trallero R. y Saló M., 2000. Nutrición y Dietética Clínica. Elsevier. España. pp 632.
- Sanz, Y., Collado C. y Dalmau J., 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*. 61:476-482.
- Sanz, Y., Collado C. y Dalmau J., 2006. Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediátrica Española*. 64:74-78.
- Sanz, Y., Collado C., Haros M. y Dalmau J., 2004. Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española*. 62:520-526.
- Scholz-Ahrens, K., Schaafsma G., van den Heuvel E. y Schrezenmeier J., 2001. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(Suplemento 2):459S-464S.
- Schrezenmeier, J. y de Vrese M., 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics - approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(Suplemento):361S-4S.
- Schwartz A., Lehmann U., Jacobasch G. y Blaut M., 2002. Influence of resistant starch on the SCFA production and cell counts of butyrate-producing *Eubacterium* spp. in the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*. 93(1):157-162.
- Silveira, M., Monereo S., Molina B., 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿cerca o lejos?. *Revista Española de Salud Pública*. 17:317-331.
- Szilagyi, A., Malolepszy P., Yesovitch S., Vinokuroff C., Nathwani U., Cohen A. y Xue X., 2007. Fructose malabsorption may be gender dependent and fails to show compensation by colonic adaptation. *Digestive Diseases and Sciences*. 52:2999-3004
- Smith, E. y Macfarlane G., 1996. Studies on amine production in the human colon: enumeration of amine forming bacteria and physiological effects of carbohydrate and pH. *Anaerobe*. 2:285-297.

- Smith, E. y Macfarlane G., 1997. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*. 3:327-337.
- Snape, W., 1988. Fisiopatología de los trastornos de la motilidad del colon. J. Edward Berk. *Bockus Gastroenterología*. Tomo IV Intestino (Parte 2): Enfermedad crónica del intestino. Colon. Salvat Editores S. A. Barcelona. pp 2633-2636.
- Soriano, G. y Guarner C., 2003. Prevención de la translocación bacteriana mediante prebióticos y probióticos. *Gastroenterología y Hepatología*. 26(Suplemento 1):23-30.
- Steer, T., Carpenter H., Tuohy K. y Gibson G., 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 13:229-254.
- St-Onge M., Farnworth E., Jones P., 2000. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71:674-681.
- Stote, K., Baer D., Spears K., Paul D., Harris G., Rumpler W., Strycula P., Najjar S., Ferrucci L., Ingram D., Longo D. y Mattson M., 2007. A controlled trial of reduced meal frequency without caloric restriction in healthy, normal-weight, middle-aged adults. *American Journal Clinical Nutrition*. 85:981-988.
- Sutton, S., Proud D., Rachui S. y Brannan D., 2002. Validation of microbial recovery from disinfectants. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 56(5):255-266.
- Thakkar, H. y Murthy R., 2005. El polietilenglicol como agente antiagregante en la preparación de microesferas de gelatina con celecoxib. *Ars Pharmaceutica*. 46(1):19-34.
- Titan, S., Bingham S., Welch A., Luben R., Oakes S., Day N. y Khaw K., 2001. Frequency of eating and concentrations of serum cholesterol in the Norfolk population of the European prospective investigation into cancer (EPIC-Norfolk): cross sectional study. *British Medical Journal*. 323(7324):1286-1288.
- Tojo, R., Leis R., Tojo R., 2001. Alimentos funcionales o nutracéuticos. *Revista Española de Pediatría*. 57:3-12.
- Tojo, R., Leis R., Tojo R., 2003. Probióticos y prebióticos en la salud y enfermedad del niño. *Gastroenterología y Hepatología*. 26:37-49.
- Tovar J., Björck I. y Asp N., 1990. Starch content and amylolysis rate in precooked legume flours. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. 38:1818-1823.
- Trallero, C., 2002. La fibra en el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades. *Nutrición Hospitalaria*. 17(Sup. 1):17-22.

- Tresguerres, J., 1999. Fisiología Humana. McGraw-Hill Interamericana. Segunda edición. Madrid. p 709.
- Topping, D. y Clifton P., 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*. 81(3):1031-1064.
- Tseng, M., Ingram D., Darden R., Ziegler R. y Longnecker M., 2000. Eating frequency and risk of colorectal cancer. *Nutrition and Cancer*. 36(2):170-176.
- Tungland, C. y Meyer D., 2002. Nondigestible oligo and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1:73-92.
- Valdez, F., De Giori G., De Ruiz P. y Oliver G., 1983. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(1):302-304.
- Valenzuela, A. y Maiz A., 2006. El rol de la fibra dietética en la nutrición enteral. *Revista Chilena de Nutrición*. 33(Sup. 2):342-351.
- Valeri, C., Ragno G., Pivacek L., Cassidy G., Srey R., Hansson-Wicher M. y Leavy M., 2000. An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80°C for up to 37 years. *Vox Sanguinis, International Journal of Transfusion Medicine*. 79:168-174.
- Valiente, N., García E., Vasserot E. y Shokouhi V., 1999. Estudio preliminar de la alteración de la flora bacteriana del colon en cerdos de cebo en casos de diarreas inespecíficas o "colitis". *Anaporc. Revista de Porcinocultura*. 19(190):17:30.
- Van der Wert, M. y Venema K., 2001. Bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:378-383.
- Van Loo, J., 2004. Prebiotics promote good health: the basis, the potential, and the emerging evidence. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 38(6, Suplemento):S70-S75.
- Vargas-Torres, A., Osorio-Díaz P., Agama-Acevedo E., Morales-Franco L. y Bello-Pérez L., 2006. Digestibilidad del almidón en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Interciencia*. 31(12):881-884.
- Vasallo, M., Casadesus D., Hernández L. y Ben M., 2002. Eficacia de una solución de polietilenglicol en la preparación del colon. Estudio preliminar. *Revista Cubana de Farmacología*. 36(1):50-55.
- Vázquez, C., Cos A., López C., Alcaráz F., 2005. Alimentación y Nutrición: Manual teórico-práctico. Ediciones Díaz de Santos. pp 470.

- Venema, K., van Nuenen M., van den Heuvel H., Pool W., y van der Vossen J., The effect of lactulose on the composition of the intestinal microbiota and short-chain fatty acid production in human volunteers and a computer controlled model of the proximal large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 15:94-105.
- Vogt, J. y Wolever T., 2003. Fecal Acetate Is Inversely Related to Acetate Absorption from the Human Rectum and Distal Colon. *The Journal of Nutrition*. 133(10): 3145–3148.
- Wang, M., Ahrné S., Jeppsson B. y Molin G., 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. 54:219-231.
- Wei, J., Connelly A, Satia J., Martin C. y Sandler R., 2004. Eating frequency and colon cancer risk. *Nutrition and Cancer*. 50(1):16-22.
- Williams, C., y Jackson K., 2002. Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. *British Journal of Nutrition*. 87(Suplemento 2):261-264.
- Willis, C., Cummings J., Neale G. y Gibson G., 1996. *In vitro* effects of mucin fermentation on the growth of human colonic sulphate-reducing bacteria. *Anaerobe*. 2:117-122.
- Wolin, M., Miller T., Yerry S., Zhang Y., Bank S. y Weaver G., 1999. Changes of fermentation pathways of fecal microbial communities associated with a drug treatment that increases dietary starch in the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7):2807-2812.
- Wolowski, G. y Pool-Zobel L., 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(Suplemento):451S-455S.
- Zamora, L., Carretero C. y Parés D., 2006. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology Internacional*. 12(1):77-84.

Construction of a model of the human proximal colon

Román Jiménez-Vera · Oscar Monroy ·
Alma Corona-Cruz · Mariano García-Garibay

Received: 13 November 2007 / Accepted: 24 June 2008 / Published online: 5 July 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract The objective of the present study was to construct a system that re-creates the conditions of fermentation and absorption of the human proximal colon. The model was constructed using a glass tube with an internal dialysis membrane tube. The food substrate was fed into the dialysis membrane three times a day simulating a typical human feeding. The substrate contained 58% carbohydrates, 35% proteins, 3% fiber, 3% starch, and 1% lipids on dry weight base, with 90% moisture. The inoculum was a fecal culture propagated in TSB. The intestinal absorption was simulated using a polyethylene glycol (PEG) solution running continuously outside the dialysis membrane. All microorganisms increased their counts after inoculation, and reached higher counts generally after substrate feed. The most important short chain fatty acids (SCFA: acetic, propionic and butyric acids) were analyzed, and their concentrations inside and outside the membrane were significantly different due to the extraction efficiency of the PEG solution. The greatest production occurred at 48 h. SCFA ratios showed that at the beginning, acetate was the predominant compound, but after 12 h the proportion of butyrate increased and the acetate was decreased. This SCFA production pattern is similar to that

reported for the proximal colon in live systems. Continuous operation of the colon model for 48 h was enough to reveal the development of microorganisms and SCFA production. This model reproduced the conditions of the human proximal colon adequately and can be used to study the development of colonic microbiota.

Keywords Colonic microbiota · Intestinal absorption · Laboratory colon model · Proximal human colon · Short chain fatty acids

Introduction

The human intestinal microbiota, consisting of a huge amount of microorganisms of many hundreds of species, plays very important roles in the promotion of health, as avoiding colonization by pathogenic microorganisms in a number of ways or degrading xenobiotics and procarcinogenic substances. Since complex relationships occur between microorganisms and food components, specific microbiota develops and in large part forms biofilms, which leads to the production of beneficial and/or essential substances as well as to the processing of many compounds from the food or from tissues of the digestive system itself. Most of this activity takes place in the lower intestinal system, in which important metabolites such as short chain fatty acids (SCFA) are produced (Gill et al. 2006; Macfarlane and Macfarlane 2006; Louis et al. 2007; Macfarlane and Dillon 2007).

The study of the influence of food components in the development of colonic microbiota is a key factor in understanding many health benefits promoted by this complex community. Nevertheless, the proximal colon is physically quite inaccessible for routine studies. Laboratory models are

R. Jiménez-Vera · O. Monroy · M. García-Garibay (✉)
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186,
Col. Vicentina, Mexico City 09340, Mexico
e-mail: jmvg@xanum.uam.mx

R. Jiménez-Vera
División Académica Multidisciplinaria de los Ríos,
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco,
Tenosique, Tabasco, Mexico

A. Corona-Cruz
Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de
Yucatán, Merida, Yucatan, Mexico

an option for the continuous evaluation of parameters, at low cost and without ethical implications (Macfarlane et al. 1998). For the model to provide real and predictable data it must be able to detect small changes in the microbial composition (Roberfroid 2001). Several models have been developed to study intestinal ecosystems. One is the Simulator of the Human Microbiology Ecosystem (SHIME) model, which uses glass containers to reproduce the stomach and intestines (De Boever et al. 2000). Duncan et al. (2003) used a single-stage fermenter operating anaerobically and under continuous culture conditions so as to follow the development of fecal inoculum exposed to different dietary substrates. Brück et al. (2003) also used a model made with glassware to evaluate two regions of the intestine, while Macfarlane et al. (1998) developed a continuous three-stage system. However, despite the fact that the “TIM” gastrointestinal models, developed at TNO in The Netherlands, are equipped with hollow fiber membranes which allow the removal of metabolic products (van der Werf and Venema 2001), most of the developed models are closed systems operating in only one flow direction, and thus the mucosal absorption of produced microbial metabolites cannot be simulated in the process (Macfarlane et al. 1998).

Physiologically the colon consists of two fundamental parts: the proximal and the distal colons. In the first part some nutrients, such as indigestible carbohydrates, accumulate and are metabolized by bacteria. Bacteria ferment the food actively in the cecum, which is the first segment of the proximal colon, and absorption of the SCFA takes place in this part, as well as along the colon (Christensen 1985). The model system proposed in this paper was designed to simulate fermentation and absorption conditions in the human proximal colon. The fermentation process in our model is continuous and tries to maintain the microbiota in equilibrium. An adequate fermentation pattern promotes the growth of the microbiota favoring beneficial bacteria (Christensen 1985; Louis et al. 2007); accordingly, produced metabolites must be absorbed by the colon in order to keep a constant fermentation pattern assuring a sort of steady state fermentation condition. Therefore, a model system in which absorption of the metabolites takes place could produce better results than closed cultures for simulating conditions in the proximal colon. Consequently, the objective of the present research was to construct a model system that would simulate the conditions of fermentation and absorption in the human proximal colon.

Materials and methods

Description of the proximal colon model

The model system was constructed with glassware as described in Fig. 1, including the fermentation tube and the

feed system. The model was maintained at 37°C within an incubator (New Brunswick G25 incubator, New Brunswick Scientific Co., Edison NJ, USA). A detailed description of the fermentation tube and its assemblage is given in Fig. 1b: it consists of a 50 cm-long glass tube with a 5 cm internal diameter, a rubber stopper at both ends, and an internal tube sustaining a dialysis membrane tube (diameter 33 mm, pore size 12,000 Da, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Food substrate

The substrate consisted of carbohydrates (58% w/w, a mixture of simple sugars and maltodextrins, Carbo Winner, Pronat ProWinner, Mexico City, Mexico), proteins (35% w/w egg albumin, Pronat ProWinner, Mexico City, Mexico), dietary fiber (3% w/w of wheat bran, Los Volcanes,

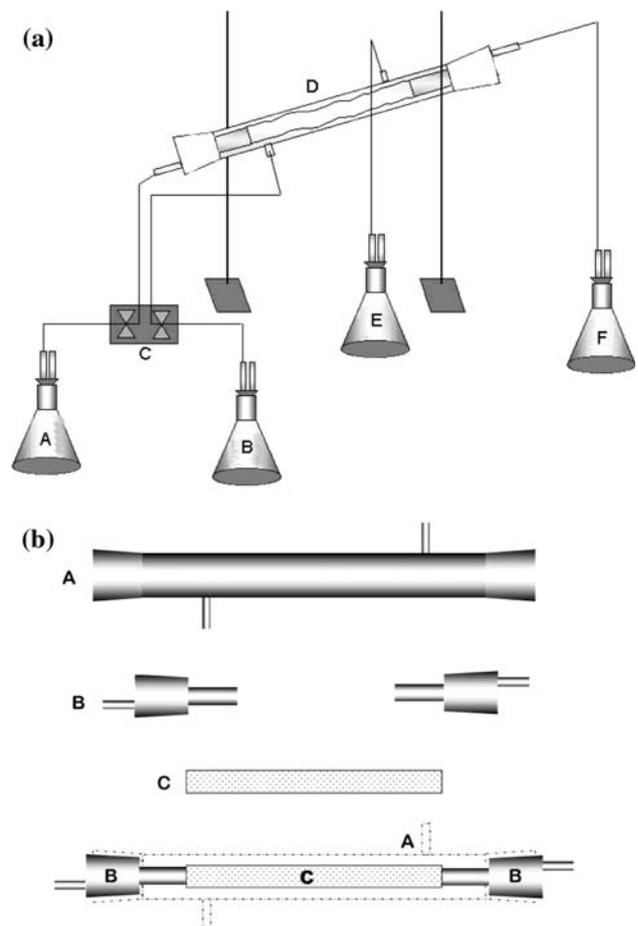


Fig. 1 (a) Diagram of the proximal colon model system. Food substrate feed (inlet flask (A)); polyethylene glycol solution (PEG) feed (inlet flask (B)); feed peristaltic pump (C); glass tube with inside membrane tube (D); PEG reception (outlet flask (E)); fermented substrate reception (outlet flask (F)). (b) Fermentation tube consisting of a glass tube (A) with a rubber stopper at both ends and internal tubes (B) for support of the dialysis membrane tube (C)

Mexico City, Mexico) and starch (3% w/w of wheat starch, Selecta, Mexico City, Mexico), at pH 8.0 and 90% w/w moisture.

Inoculum

Human feces were used as the source of the inoculum. Samples were donated by three healthy young men who had not taken any kind of antibiotics for at least three months before the donation. The feces (20 g) were suspended in 80 ml of sterile distilled water and homogenized, stirring with a glass rod, and then the suspension was filtered through a sterile gauze; a fresh 20% w/v fecal solution was thus obtained.

Propagated-concentrated inocula were prepared using 5 ml of the fresh 20% fecal solution to inoculate 95 ml of trypticase soy broth (TSB, Difco, Detroit, MI, USA) which was then incubated at 37°C for 24 h. Subsequently, the microorganisms were separated by centrifugation (3,220 × g, 15 min) with a Beckman J2-MI centrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA), and suspended in 1 ml of TSB broth containing 20% v/v glycerol (J. T. Baker, Mexico). Several TSB-glycerol suspended cultures were prepared at the same time, frozen at –20°C, and used when required to inoculate 150 g of the initial batch of food substrate fed into the model at the beginning of every run. TSB-glycerol cultures were kept no longer than 6 months; their microbial composition did not change during this period. In order to validate the TSB propagated inoculum, we analyzed it microbiologically and compared it with the original fresh 20% fecal solution.

Operation of the proximal colon model

The internal tube of the model was initially filled with 150 g of food substrate inoculated with a TSB-glycerol culture, and then this was fermented for the first 6 h of the run. The food substrate was inoculated with the TSB-glycerol suspended culture only once at the beginning of the process. Thereafter, the system was fed in amounts of 100 g by means of a peristaltic pump (Masterflex, Cole-Parmer Instruments Company, Vernon Hills, IL, USA) at a flow rate of 5.0 ml/min, three times every 6 h during the hours of daylight and left to rest overnight, simulating typical human feeding. Different tube positions were tried: vertical, horizontal and slanted. In the vertical position, the membrane broke because the substrate did not rise. In the horizontal position, the substrate reached the end of the tube quickly and air bubbles formed. Therefore, the best position was slanted with an approximate angle of 30° as shown in Fig. 1a, because the membrane did not break and no bubbles formed. The food substrate was fermented inside the model with a residence time established by the next feed; the new substrate displaced the fermented one,

and it was collected in the reception flask (Fig. 1a); a sample was immediately taken for microbiological analyses, and the rest of the sample was frozen at –20°C for further SCFA analysis.

In order to simulate the intestinal absorption, we used a PEG solution containing 26.25 g/l polyethylene glycol 4000 (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs Switzerland), 0.36 g/l NaHCO₃ (J. T. Baker, Mexico) and 0.7 g/l NaCl (J. T. Baker, Mexico), as the dehydrating medium; its pH was adjusted to 9.5 with 1 N NaOH (J. T. Baker, Mexico). The PEG solution was fed into the gap between the inner wall of the glass tube and the outer wall of the membrane tube (see Fig. 1); it was pumped at a flow rate of 2.1 ml/min by means of a Masterflex peristaltic pump (Cole-Parmer Instruments Company, Vernon Hills, IL, USA) through the whole experiment.

Microbiological analyses

The different groups of microorganisms which were in the inocula and in samples of fermented substrate obtained from the model system were counted using the appropriate media, as indicated in Table 1. The growth was quantified by the Miles and Misra (1938) method, dropping 5 µl of each dilution (up to 10⁻¹⁰) on a Petri dish, with the selective agar for each group of microorganisms. The microorganisms were incubated at 37°C for 24 h; the anaerobic counts were incubated inside anaerobic jars (GasPack, Merck, Darmstadt, Germany).

Short chain fatty acids analyses

Frozen fermented samples were thawed and centrifuged for 5 min at 3,220 × g at 4°C, using a Beckman J2-MI centrifuge

Table 1 Media for growth of specific groups of microorganisms from fecal samples

Microorganisms	Media	Brand
Total aerobes	Nutritive agar	Dibico ^a
Enterobacteria	MacConkey agar	Bioxon ^b
Coliforms	Violet Red Bile agar	Dibico ^a
Lactococci	M-17 agar	Oxoid ^c
Enterococci	Blood with Azide agar	Bioxon ^b
Total anaerobes	Anaerobic agar	Difco ^d
Facultative anaerobes	Nutritive agar	Dibico ^a
Lactobacilli	Rogosa agar	Difco ^a
Bifidobacteria	Beerens agar	Prepared ^e
Clostridia	Clostridium agar	Fluka ^f
Bacteroides	Anaerobic Neomycin Blood agar	Remel ^g

^a Dibico S.A., Mexico City, Mexico. ^b Bioxon, Cucutitlán-Izcalli Edo. de Mexico, Mexico. ^c Oxoid Ltd., Basingstoke, UK. ^d Difco Laboratories, Detroit, MI, USA. ^e Prepared according to Beerens (1990), modified by Beerens (1991). ^f Fluka BioChemika, Sigma Aldrich, Buchs Switzerland. ^g Remel, Lenexa, KS, USA

(Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA); supernatants (950 μ l) were placed in Eppendorf tubes and 50 μ l of 50% v/v HCl were added. Then the samples were centrifuged for 10 min at $12,280 \times g$ at 4°C (Eppendorf Microcentrifuge 5417 C, Eppendorf AG Hamburg, Germany) and supernatants were analyzed. Short chain fatty acids (SCFA: acetic, propionic and butyric acids) were quantified by gas liquid chromatography in a Hewlett Packard 5890 series II chromatograph, fitted with a flame ionization detector and with an AT-1000 capillary column (Hewlett-Packard Co. Palo Alto, CA, USA). The oven temperature was 120°C , the injector temperature was 130°C , and the detector temperature was 150°C . The concentrations of SCFA were calculated using external standards: 100% acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany), 99% propionic acid and 99% butyric acid (Sigma-Aldrich). Total SCFA was the sum of the three acids.

Statistical analysis

The logarithm numbers of bacterial counts and SCFA concentrations were statistically analyzed by ANOVA. In order to discriminate among the mean values, we used Fisher's least significant difference (LSD). All statistical analyses were carried out using the statistical analysis software Statgraphics Plus 6.1 (Statpoint Inc. Herndon, VA, USA), with $\alpha = 0.05$ used as a threshold of statistical significance.

Results and discussion

Evaluation of the inoculum

According to Macfarlane et al. (1998), a fresh fecal inoculum prepared from a 20% solution of feces can be used to simulate human colon microbiota. In order to avoid the introduction of fecal solids and to reduce the interferences produced by fecal material in the colon system, we propose the use of a TSB propagated-concentrated inoculum, using a culture preserved in TSB-glycerol as described above. The handling of a fresh inoculum is also expected to be more difficult and to have less reproducible results. Furthermore, the natural microbiota inside the colon is always under constant changes and is influenced by exogenous factors (food and environmental events); the use of a fecal inoculum propagated in TSB should help to control this variable. Nevertheless, the inoculum here proposed was validated comparing the counts of different bacteria groups in both the fresh 20% fecal solution proposed by Macfarlane et al. (1998), and in the TSB propagated-concentrated inoculum; results are shown in Table 2.

One can see that the microorganism concentrations in the TSB propagated-concentrated inoculum were similar to or

Table 2 Microorganisms counted (log CFU/ml) in the TSB propagated-concentrated inoculum and its comparison with the 20% fecal solution

Bacteria	TSB	20% Fecal
Total aerobes	8.73 ± 0.85^a	7.25 ± 0.49^b
Enterobacteria	6.07 ± 0.80^a	7.20 ± 0.57^a
Coliforms	5.93 ± 0.65^a	7.05 ± 0.35^a
Lactococci	8.43 ± 0.32^a	7.95 ± 0.49^a
Enterococci	8.60 ± 0.26^a	7.00 ± 0.14^a
Total anaerobes	9.07 ± 0.40^a	7.45 ± 0.49^b
Facultative anaerobes	8.13 ± 0.76^a	6.30 ± 1.41^a
Lactobacilli	7.00 ± 0.26^a	5.30 ± 0.00^b
Bifidobacteria	6.83 ± 0.21^a	4.15 ± 0.21^b
Clostridia	7.30 ± 0.30^a	7.10 ± 0.28^a
Bacteroides	7.81 ± 0.34^a	5.10 ± 0.20^b

Results are mean values from three determinations \pm SD. ^{a,b}Values with different letters in the same row are significantly different

higher than microorganism concentrations in the 20% fecal solution in most cases. There were more anaerobic bacteria including bifidobacteria, lactobacilli and bacteroides in the former than in the latter. Coliforms, enterobacteria and the other groups did not show significantly different counts. Based on these results, we considered the TSB propagated-concentrated inoculum sufficiently effective to replace the fresh inoculum proposed by Macfarlane et al. (1998), and therefore we used it all along the study of the colon model system.

Fermentation in the colon model

In order to formulate the substrate used in the model, we reproduced the quantity and kind of nutrients that normally compose human food in the colon. The water content of the substrate used by Macfarlane et al. (1998) was 96%, while Cummings (1997) proposed 85%. In our study, moisture of the substrate was 90% because it allowed the most adequate flow of the material.

In addition to the food residue, the bacteria are the other principal component of the system. A healthy normal person is assumed to have in the colon more than 10^{12} bacteria of 400 different species, and these can reach up to 400–500 g (Cummings 1997; Guarner 2002; Macfarlane and Macfarlane 2004). These conditions are practically impossible to reproduce, but a close approximation should assure high counts of the most important groups of bacteria.

Figure 2 shows the development of the different groups of bacteria along the 48 h of fermentation in the colon model system, as well as the total growth which is the log of the sum of the microbial counts of all groups of bacteria. From the initial inoculation (0 h) up to the 6 h of fermentation there was a population increase in all the cases,

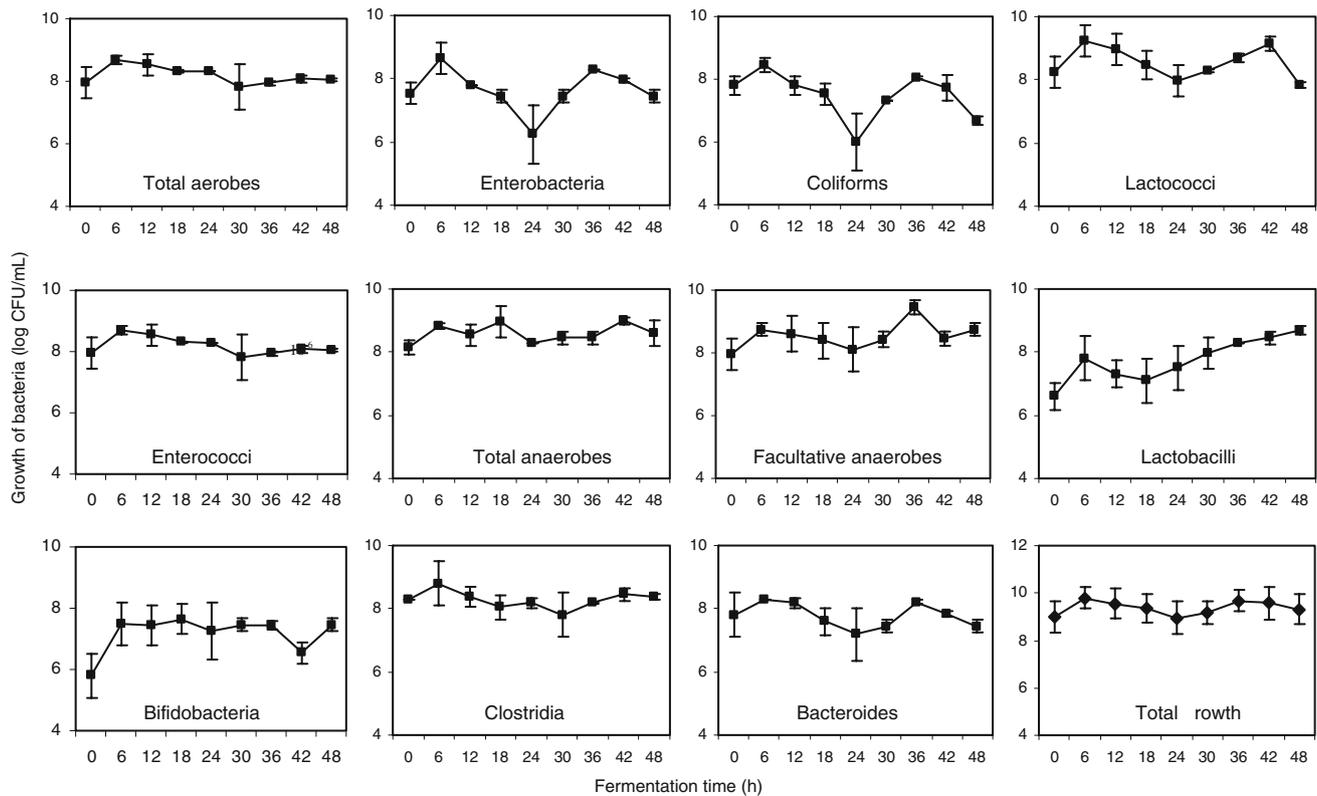


Fig. 2 Growth of different groups of microorganisms in the model system (log CFU/ml). Total growth is the log of the sum of the microbial counts of all groups of bacteria. Results are mean values from three determinations

followed by a general trend to decrease with the lowest count between 18 and 24 h; these situations were clearly reflected in the total count, even when this graph was flatter than any specific growth profile. The system was fed at 6 and 12 h, whereas during the period between 12 and 24 h no substrate was introduced into it, which could explain why the microbial counts diminished during this period of time. At 24 h, we took a sample first and then fed the system a new substrate; the microbial counts rose continuously from this time on through 36–42 h. Considering that the feedings were done at 24, 30 and 36 h, we can say this confirms that most of the microbial populations were sensitive to the introduction of new substrate to the system. Among the less sensitive population to the substrate feeding were enterococci and clostridia showing the less evident changes of populations. The three groups with a greater concentration of microorganisms were total aerobes (8.59 ± 0.09), facultative anaerobes (8.54 ± 0.06) and lactococci (8.54 ± 0.05).

In some experiments microbial counts were followed for up to 72 h of fermentation (data not shown), and results were very close to those reported in Table 3 for all the bacterial groups at 48 h; therefore, the counts remained unchanged from 48 to 72 h. However, the experiments reported here were carried out only for 48 h because the

Table 3 Bacterial population (log UFC/ml) of the proximal colon models obtained by A Macfarlane et al. (1998); B van der Werf and Venema (2001); and C this study, where figures are the mean counts along the 48 h of fermentation

Bacteria	A	B	C
Total aerobes	n.r.	n.r.	8.45 ± 0.42
Enterobacteria	n.r.	5–6	7.66 ± 0.72
Coliforms	8.5	n.r.	7.44 ± 0.79
Lactococci	n.r.	n.r.	8.57 ± 0.53
Enterococci	8.6	5–6	8.22 ± 0.30
Total anaerobes	10.4	n.r.	8.64 ± 0.26
Facultative anaerobes	8.7	n.r.	8.61 ± 0.40
Lactobacilli	n.r.	5–7	7.69 ± 0.57
Bifidobacteria	10.1	9–10	7.37 ± 0.36
Clostridia	8.5	4–5	8.28 ± 0.30
Bacteroides	n.r.	9–10	7.78 ± 0.42
Total counts	n.r.	n.r.	9.42 ± 0.28

Results in C are mean values from three determinations \pm SD. n.r., not reported

membrane tube hardly resisted the mechanical stress applied by the substrate pumping beyond that time.

The results of our study agree with those of Macfarlane et al. (1998) and van der Werf and Venema (2001), as

shown in Table 3 where data from those reports are compared with the mean values along the fermentation obtained in the present study. Additionally, our results agree with those reported by Marteau et al. (2001) for culture counts in samples taken from the cecum of eight volunteers; according to these data, the bifidobacteria group is quite behind the one reported in the other models. However, Marteau et al. (2001) say the values reported by Macfarlane et al. (1998) and van der Werf and Venema (2001) could be high compared with the usual values in the human colon, given that the cecal microbiota contains 100 times less *Bifidobacterium* than the fecal culture.

Absorption

In order to have a more dynamic system in which the absorption of the metabolites produced by the microorganisms simulates the intestinal absorption, we circulated the PEG solution constantly outside the membrane. The PEG solution design was based on the composition of a therapeutic colon wash solution, but diluted 4×; the final criterion was to have an adequate absorption of moisture and metabolites, yet prevent the substrate from becoming dry and keeping it fluid enough to have an adequate transit inside the system.

The pH in the PEG solution that circulated outside the dialysis membrane was finally adjusted to 9.5; thus the pH of the substrate was maintained close to 5.5, which is the normal pH of the proximal colon (Nugent et al. 2001). When we used the PEG solution with lower pHs, the pH of the substrate fell to very low values.

Such a solution was able to absorb the SCFA produced by the bacteria, as will be further discussed below. In contrast, a previously tested salt solution (containing 10% NaCl, 0.1% NaHCO₃, adjusted at pH 9.5 with 1 N NaOH)

was not able to absorb SCFA. Propionic and butyric acids were not detected in this saline solution, while the maximum concentration of acetic acid found here was less than 0.6 mM.

Short-chain fatty acids production

Figure 3 shows the three most important SCFA (acetic, propionic and butyric acids) measured in the model inside and outside the dialysis membrane. The total production of SCFA reached a concentration of up to 32.8 mM inside the membrane and 6.8 mM outside of it; these concentrations differed significantly.

Total SCFA production was highest at 48 h. Interestingly, however, there was a peak in the SCFA production inside the membrane at 24 h, whereas in general the microbial counts reached their lowest value at this point. If one considers that variation of the microbial counts was related to the amount of available substrate, the maximum production of SCFA seems to have occurred when the amount of substrates was lowest, which means that the highest production of SCFA was reached during the longest periods with no feeding (24 and 48 h), at least for acetic and butyric acids.

Also, in general, the higher the length of the fatty acid, the higher the concentration outside the membrane along fermentation; particularly in the case of butyric acid, the proportion to total SCFA was quite higher outside than inside the membrane at the advanced stages of fermentation (Table 4). This could have been due to the extraction efficiency of the PEG solution, given that the partition is better for the longer more hydrophobic chains. Interestingly, in the human colon, since passive diffusion is the predominant mechanism of absorption of SCFA, the absorption increases in relation to the chain length of the

Fig. 3 Concentrations (mM) of short chain fatty acids produced in the model system inside ■ and outside ▨ the dialysis membrane. Data are mean values from five determinations

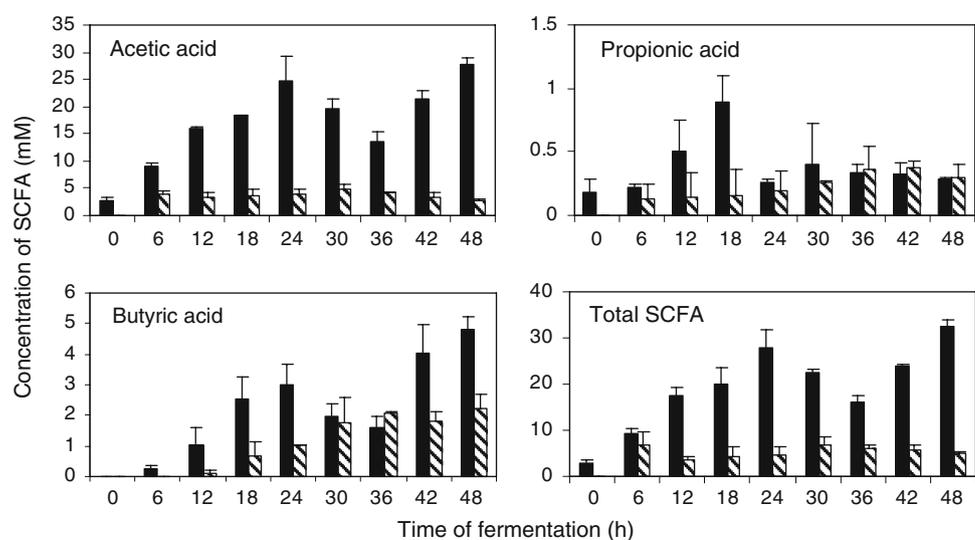


Table 4 SCFA ratios produced in the model inside and outside the membrane along 48 h

	Time (h)								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Inside									
Acetate/total	0.94 ± 0.02	0.95 ± 0.01	0.91 ± 0.06	0.86 ± 0.03	0.88 ± 0.04	0.89 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.85 ± 0.01
Propionate/total	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Butyrate/total	0	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01
Outside									
Acetate/total	0	0.97 ± 0.02	0.93 ± 0.04	0.84 ± 0.08	0.75 ± 0.02	0.71 ± 0.04	0.63 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.52 ± 0.05
Propionate/total	0	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.07	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.02
Butyrate/total	0	0	0.02 ± 0.03	0.14 ± 0.05	0.21 ± 0.06	0.25 ± 0.05	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.42 ± 0.08
Total									
Acetate/total	0.94 ± 0.02	0.95 ± 0.00	0.92 ± 0.04	0.85 ± 0.01	0.86 ± 0.03	0.85 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.01
Propionate/total	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Butyrate/total	0	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.13 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01

Data are mean values from five determinations ±SD

fatty acid, absorption of butyric acid being significantly greater than that of acetic acid (Vogt and Wolever 2003). According to Vogt and Wolever (2003) the mean percentage of absorption of acetic acid in human colon is 24%, while for propionic acid it is 28% and for butyric acid 30%. The data presented in Fig. 3 show that the mean concentrations of acetic and butyric acids outside the membrane were 23% and 47% of the concentration inside the membrane respectively, which agrees with absorption data from the real human colon. Propionic acid exhibited poorer production, particularly at the end of fermentation, and concentration was higher outside the membrane than inside. In general, the absorption system using this PEG solution can be considered an effective approach to simulate the absorption of SCFA in the human colon.

SCFA ratios in the model system (Table 4) revealed that at the beginning of the fermentation, acetate was by far the predominant compound, and that the proportion of the other two compounds was very low. However, after 12 h the proportion of butyrate increased and that of acetate decreased. Significant changes were not observed for the propionate ratio. Low production of propionate is also reported by other authors (Duncan et al. 2003; Macfarlane and Macfarlane 2006) depending on the substrate and the microbiota.

In the colon, the normal proportion of SCFA is about 60% acetic, 20% propionic and 20% butyric acids (Macfarlane and Cummings 1991). Nevertheless, the molar proportion of these products depends on a number of factors, including diet and microbiota (Louis et al. 2007). In our study, concentration of acetic acid was very high at the beginning of the fermentation, but its proportion tended to diminish as fermentation developed. On the other hand, the amount of butyric acid was 0 when fermentation began, but

it increased through the process and reached 18% of the total SCFA at 48 h. Propionic acid remained at very low proportions all the time.

An experiment was run in which TSB was fed into the model system instead of the food substrate and the SCFA were determined. Results are shown in Table 5. In this experiment the pH did not reach the value of 5.5, which was usual when the food substrate was used; instead, the pH in the TSB was not lower than 6.5, indicating a poor production of SCFA. The low values of butyric acid obtained in this substrate were due to the lack of starch, which has an important role in the production of this metabolite in the colon (Ahmed et al. 2000; Schwiertz et al. 2002). According to Duncan et al. (2003), the SCFA proportions are strongly affected by the substrate; they obtained the highest proportion of butyrate (13.6%) when they used amylopectin as substrate. This value is consistent with our results (Table 4) when the food substrate was fed into the system. These authors also report that they obtained very high proportions of acetate when they used other substrates such as pectin.

Macfarlane and Macfarlane (2006) indicate that the SCFA proportions depend not only on the substrate, but

Table 5 Short chain fatty acids produced when TSB was used as substrate in the colon model system

Acetate		Propionate		Butyrate	
Inside	Outside	Inside	Outside	Inside	Outside
14.5	11.96	1.86	1.40	0.36	0.29
24 h	18 h	24 h	24 h	30 h	30 h

Values are the maximum concentrations reached (mM) within the 48 h of fermentation inside and outside the membrane; the time in which these concentrations were reached is indicated below the concentration

also on the kind of microbiota in terms of whether they are either biofilm forming or nonadherent bacteria. Our study revealed SCFA proportions (see Table 4) which were closer to their results when they used starch as the substrate for the nonadherent bacteria (0.8:0.06:0.22 for acetate, propionate and butyrate, respectively); for the same substrate but with the biofilm population, the proportion of butyrate was lower (0.88:0.04:0.08). This means that the population developed in our colon model was metabolically more similar to the nonadherent microbiota, which is not surprising since the fecal microbiota is composed mainly of nonadherent bacteria. Therefore, it is important to consider that results obtained from the proposed model will depend on the kind of inoculum used; in the current study, the inoculum was obtained from faeces, and certainly different results should be expected with a microbiota directly obtained from colonic biopsies.

Conclusions

Continuous operation of the colon model for 48 h demonstrated the capability of the system to simulate the colon function and showed the effect of the food substrate on maintaining the microbiota. The absorption system reproduced the conditions of the human proximal colon adequately in terms of SCFA absorption. We were able to monitor the microbial population and SCFA production without difficulty along the fermentation and the system reproduced the conditions of the human colon well. Thus, our model system could be used to study the colonic microbiota, and applications could be made to study changes induced by diet and by components such as prebiotics. At this time, the model is being used to study the prebiotic effect of resistant starch. Results will be published elsewhere.

References

- Ahmed R, Segal I, Hassan H (2000) Fermentation of dietary starch in humans. *Am J Gastroenterol* 95:1017–1020. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.01848.x
- Beerens H (1990) An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* sp. *Lett Appl Microbiol* 11:155–157. doi:10.1111/j.1472-765X.1990.tb00148.x
- Beerens H (1991) Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl Environ Microbiol* 57:2418–2419
- Brück WM, Graverholt G, Gibson GR (2003) A two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropeptide on mixed cultures of human gut bacteria challenged with enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* serotype *typhimurium*. *J Appl Microbiol* 95:44–53. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01959.x
- Christensen J (1985) The response of the colon to eating. *Am J Clin Nutr* 42:1025–1032
- Cummings JH (1997) The large intestine in nutrition and disease. Danone Chair monograph, Institut Danone, Brussels, Belgium
- De Boever P, Deplancke B, Verstraete W (2000) Fermentation by microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *J Nutr* 130:2599–2606
- Duncan SH, Scott KP, Ramsay AG, Harmsen HJM, Welling GW, Stewart CS et al (2003) Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Appl Environ Microbiol* 69:1136–1142. doi:10.1128/AEM.69.2.1136-1142.2003
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS et al (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312:1355–1359. doi:10.1126/science.1124234
- Guarner F (2002) El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. *Nutr Hosp* 17(Sup 2):7–10
- Louis P, Scott KP, Duncan SH, Flint HJ (2007) Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J Appl Microbiol* 102:1197–1208. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03322.x
- Macfarlane GT, Cummings JH (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 70:443–459
- Macfarlane S, Dillon JF (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 102:1187–1196. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2004) Bacterial diversity in the human gut. *Adv Appl Microbiol* 54:261–289
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2006) Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut. *Appl Environ Microbiol* 72:6204–6211. doi:10.1128/AEM.00754-06
- Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR (1998) Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb Ecol* 35:180–187. doi:10.1007/s002489900072
- Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bemalier A, Corthier G (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 67:4939–4942. doi:10.1128/AEM.67.10.4939-4942.2001
- Miles AA, Mistra SS (1938) The estimation of the bacteriological power of the blood. *J Hyg (Lond)* 38:732
- Nugent S, Kumar D, Rampton D, Evans D (2001) Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with amino salicylates and other drugs. *Gut* 48:571–577. doi:10.1136/gut.48.4.571
- Roberfroid MB (2001) Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *Am J Clin Nutr* 73(supl):406S–409S
- Schwartz A, Lehmann U, Jacobasch G, Blaut M (2002) Influence of resistant starch on the SCFA production and cell counts of butyrate-producing *Eubacterium* spp. in the human intestine. *J Appl Microbiol* 93:157–162. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01679.x
- van der Werf MJ, Venema K (2001) Bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon. *J Agric Food Chem* 49:378–383. doi:10.1021/jf000952o
- Vogt JA, Wolever TMS (2003) Fecal acetate is inversely related to acetate absorption from the human rectum and distal colon. *J Nutr* 133:3145–3148



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00047

Matrícula: 202385644

CONSTRUCCION DE UN MODELO DE COLON PROXIMAL HUMANO PARA EL ESTUDIO DE PREBIOTICOS.

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 19 del mes de marzo del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO
- DRA. JUDITH JIMENEZ GUZMAN
- DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO
- DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: ROMAN JIMENEZ VERA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

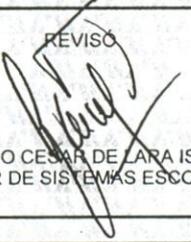
Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



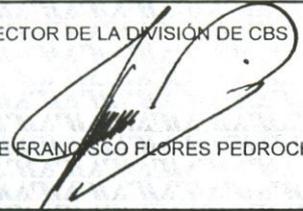

ROMAN JIMENEZ VERA
ALUMNO

REVISÓ



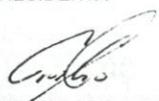
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS



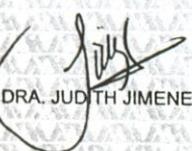
DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

PRESIDENTA



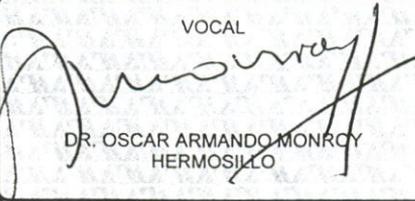
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

VOCAL



DRA. JUDITH JIMENEZ GUZMAN

VOCAL



DR. OSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO

SECRETARIO



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL