



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

**Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei*
Shirota y *Escherichia coli* en un sistema de simulación del tracto
intestinal.**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.I. Ivonne Figueroa González

DIRECTOR:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

ASESORES:

Dr. José Mariano García Garibay

Dr. Humberto Hernández Sánchez

Marzo de 2007

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O”

Iztapalapa, D. F., a 22 de marzo de 2007

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

Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli* en un sistema de simulación del tracto intestinal.

Que presentó

I.B.I. Ivonne Figueroa González

Director:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Jurado:

Dr. José Mariano García Garibay (Presidente)

Dra. Ma. de Lourdes Escamilla Hurtado (Secretario)

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano (Vocal)

Dr. Humberto Hernández Sánchez (Vocal)

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

Quiero agradecer a mis padres Lilia y César por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de los años, sin ustedes nunca hubiera logrado mis sueños. Gracias por enseñarme el valor de una familia.

A la Mtra. Lorena Gómez y la Dra. Judith Jiménez muchas gracias por estar conmigo, al Dr. Mariano García, gracias por los valiosos consejos, al Dr. Humberto Hernández, gracias por haber formado parte de este trabajo, a la Dra. Gabriela Rodríguez, muchas gracias por sus consejos en momentos difíciles y la ayuda que siempre me ha dado. A la Dra. Lourdes Escamilla, muchas gracias por su valiosa colaboración en este trabajo, en verdad he aprendido mucho de usted.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Alma Cruz, por confiar en mi y estar siempre apoyándome, muchas gracias por todo lo que me ha enseñado. Es un placer que sigamos trabajando juntas.

A mis compañeros de laboratorio, muchas gracias por su compañía y apoyo. A mis amigos Juan Carlos García y José Juan Durán, muchas gracias por haber estado conmigo todo este tiempo, en verdad los aprecio. Claudia Figueroa, sabes que eres una hermana para mí, te doy las gracias por todos esos ratos buenos y malos que hemos compartido, pero sobre todo, te doy las gracias por haberme brindado una amistad tan sincera y hermosa.

A mi hermano Josué, gracias a ti nunca he estado sola. Siempre has sido mi mejor compañía.

Dedico ésta tesis a dos personas muy importantes en mi vida, a mi abuelo Cuauhtémoc quien siempre me ha enseñado que todo es posible si se hace con alegría. A Guillermo, muchas gracias por compartir este momento conmigo y por enseñarme a luchar por mis sueños. Los quiero.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Prebióticos	3
2.1.1 Disacáridos	4
2.1.2 Oligosacáridos	4
2.1.2.1 Fructooligosacáridos	7
2.1.2.2 Galactooligosacáridos	8
2.1.2.3 Oligosacáridos derivados de la soya	11
2.1.2.4 Lactoferrina	11
2.2 Probióticos	14
2.2.1 Metabolismo de las bacterias lácticas	16
2.2.2 Mecanismos de acción de los prebióticos	17
2.2.2.1 Generación de compuestos inhibidores	19
2.2.2.2 Producción de bacteriocinas	19
2.2.3 Estudios con microorganismos probióticos	22
2.3 Simbióticos	26
2.4 Aparato digestivo	29
2.5 Microflora intestinal	32
2.6 Simulación <i>in vitro</i> del tracto intestinal	34
3. Objetivo	38
4. Hipótesis	38

5. Metodología	39
5.1 Microorganismos	39
5.2 Simulación del tracto intestinal	39
5.3 Cuantificación del crecimiento microbiano	40
5.4 Determinación de pH en las regiones simuladas	41
5.5 Pruebas de inhibición (pH y bacteriocinas)	41
5.6 Consumo de la fuente de carbono	42
5.7 Análisis de consumo de Oligomate 55 por HPLC	43
5.8 Consumo de Oligomate 55 por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	43
5.9 Análisis de resultados	43
6. Resultados y Discusión	44
6.1 Cuantificación del crecimiento durante la simulación del tracto intestinal	44
6.2 Consumo de la fuente de carbono	51
6.3 Consumo de Oligomate 55 por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	57
6.4 Pruebas de inhibición (pH y bacteriocinas)	58
7. Conclusiones	61
8. Bibliografía	62

RESUMEN

El presente trabajo, tuvo como objetivo determinar el efecto de un galactooligosacárido comercial (Oligomate 55) y una proteína (lactoferrina) sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli* buscando estimular el crecimiento del primero y disminuir el del segundo cuando ambos se encontraban en un sistema que simulaba durante 33 h algunas de las regiones del tracto intestinal (intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente). En los resultados obtenidos al final del experimento, se observó que bajo las condiciones de trabajo utilizadas, el Oligomate 55 incrementó el número de *L. casei* Shirota y también aumentó la población de *E. coli* en comparación con el medio control que contenía glucosa, siendo las poblaciones iniciales para *L. casei* Shirota de 7.6 y 7.599 \log_{10} (ufc/mL) en glucosa y Oligomate 55 respectivamente y finales de 11.334 \log_{10} (ufc/mL) en glucosa y 12.143 \log_{10} (ufc/mL) en Oligomate 55. En el caso de *E. coli* las poblaciones fueron de 7.457 \log_{10} (ufc)/mL al inicio de la simulación y de 9.424 \log_{10} (ufc)/mL al final en el medio con glucosa y de 7.557 \log_{10} (ufc/mL) al inicio y 10.264 \log_{10} (ufc/mL) al final para el medio con Oligomate 55. Con la combinación de lactoferrina y Oligomate 55 se obtuvieron las menores cantidades de unidades formadoras de colonias, siendo de 7.9 \log_{10} (ufc)/mL al inicio y 9.482 \log_{10} (ufc/mL) al final para *L. casei* Shirota y 7.799 \log_{10} (ufc)/mL al inicio y 9.398 \log_{10} (ufc/mL) al final para *E. coli*). El análisis de la fuente de carbono contenida en los medios utilizados mostró que los galactooligosacáridos (compuesto prebiótico) contenidos en el Oligomate 55 no fueron consumidos por los microorganismos estudiados, lo que descarta la posibilidad de que exista un efecto de estimulación del prebiótico sobre el crecimiento de *L. casei* Shirota y de *E. coli*, y muestra que el crecimiento de ambos, estuvo sostenido por otros azúcares (lactosa, glucosa y galactosa) presentes en la composición del producto utilizado. De acuerdo a lo anterior, la inhibición en el crecimiento de *E. coli* observada en las pruebas realizadas, podría deberse a la presencia de la bacteria probiótica y a los compuestos inhibidores producidos por uno o ambos microorganismos.

Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli* en un sistema de simulación del tracto intestinal.

1. INTRODUCCIÓN

El interés por mantener una salud apropiada mediante la modificación de la dieta se ha incrementado durante los últimos años buscando mejorar la microflora intestinal con la finalidad que ésta a su vez proporcione un efecto benéfico en la salud del huésped. Es por esto que se han realizado estudios en los cuales se utilizan microorganismos llamados probióticos, que son capaces de establecerse en el tracto intestinal, y así formar parte de la flora intestinal propia de cada individuo y fortalecerla, y sustancias alimenticias denominadas prebióticos que estimulan el crecimiento de los microorganismos ya mencionados; cuando se combinan los probióticos y prebióticos se espera que el efecto que ejerce cada uno por separado se vea incrementado.

Debido a los beneficios que potencialmente se pueden obtener como resultado de la manipulación de la microflora intestinal en términos de prevención de enfermedades gastrointestinales, de supresión del establecimiento de bacterias nocivas y promoción del desarrollo de bacterias benéficas, este estudio se enfoca a determinar el efecto prebiótico de una proteína y un azúcar (galactooligosacárido) en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota en presencia de *Escherichia coli*; de esta forma, se pretende conocer la evolución de ambas poblaciones cuando se administran los prebióticos. Para esto se llevó a cabo una simulación *in vitro* de algunas partes del tracto intestinal (intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente) en pequeños frascos de vidrio bajo condiciones semejantes a los fluidos intestinales. Se utilizó *L. casei* Shirota como probiótico y *E. coli* como microorganismo patógeno. En el medio de cultivo se utilizó Oligomate 55 como prebiótico y fuente de carbono y en algunos experimentos se adicionó lactoferrina que es una proteína con función prebiótica. Con la finalidad de dar continuidad al sistema, al finalizar el tiempo de la primera región, se transfirió su contenido al siguiente

fermentador (siguiente región) y así sucesivamente hasta terminar la simulación; de igual forma se realizó una fermentación control para la comparación la cual no cuenta con el prebiótico y utiliza como fuente de carbono la glucosa. Finalmente, para determinar el efecto producido se analizó el crecimiento mediante la cuenta bacteriana de las poblaciones de ambos microorganismos en unidades formadoras de colonias (ufc)/mL, la producción de metabolitos que pudieran inhibir el crecimiento de la bacteria patógena (bacteriocinas) y el consumo de la fuente de carbono.

2. ANTECEDENTES

Es de sobremanera reconocido que la comunidad bacteriana del intestino tiene influencia sobre la salud y el bienestar. La dieta contiene nutrientes que en su mayoría, son absorbidos en el intestino delgado, algunos de ellos escapan a la digestión por las enzimas propias del intestino y a enzimas pancreáticas y son el sustrato principal de las bacterias residentes en el tracto intestinal humano. Cómo un gran número de efectos sobre la salud son mediados por la microflora intestinal, la dieta es la llave para influir en su composición y actividad. De esta forma, la nutrición puede ser considerada como una herramienta para influenciar la microbiota intestinal mediante la ingestión de probióticos y prebióticos (Blaut, 2002). Estos compuestos son capaces de modificar la microflora intestinal de forma que las actividades de las bacterias benéficas para el huésped son estimuladas y las actividades de las bacterias dañinas son suprimidas (Simmering y Blaut, 2001).

2.1 Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un grupo de bacterias en el colon, mejorando así la salud del huésped (Simmering y Blaut, 2001). Los prebióticos se han convertido en artículos importantes dentro del área de alimentos funcionales por que pueden ejercer beneficios en los humanos mediante una influencia positiva en la composición de la microflora intestinal; científicos han mostrado evidencia de que algunos de estos compuestos son capaces de promover el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el colon ya que pueden atravesar la parte superior del tracto intestinal sin ser hidrolizados (Kneifel *et al.*, 2000). Los criterios que permiten la clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico incluyen (Fooks *et al.*, 1999):

- a) No ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto intestinal.
- b) Fermentación selectiva por bacterias potencialmente benéficas en el colon.

c) Alteración en la composición de la microbiota colónica para una composición más saludable.

d) Preferentemente, inducen efectos que son benéficos para la salud del huésped

Los ingredientes normalmente definidos y estudiados como prebióticos son disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos y de entre éstos, los que han enfocado mayor interés son los galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) (Crittenden y Playne, 1996; Voragen, 1998).

2.1.1 Disacáridos

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

2.1.2 Oligosacáridos

Los oligosacáridos son usualmente definidos como glicósidos que no son digeridos por el humano por la presencia de ciertos enlaces característicos. Los oligosacáridos proporcionan muchos beneficios en cuanto a manufactura de alimentos y salud que los hacen muy atractivos para su uso. En general los oligosacáridos en alimentos no son productos puros, son mezclas que contienen oligosacáridos de diferentes grados de polimerización, son solubles en agua y ligeramente dulces, típicamente 0.3-0.6 del poder edulcorante de la sacarosa (Crittenden y Playne, 1996). Durante las últimas décadas un gran número de oligosacáridos se ha introducido al mercado de los alimentos funcionales, en la Tabla 1 (Delzenne y Roberfroid, 1994) se presenta un resumen de los principales oligosacáridos y el nombre comercial del producto. Los oligosacáridos presentes en la

dieta difieren unos de otros en su estructura química: el grado de polimerización (de 2 a 50 unidades monosacáridas) o tipo de hexosas (por ejemplo glucósidos, fructósidos, galactósidos); la posición y conformación (β -, α -) de los enlaces entre las unidades. Todas estas características no sólo tienen consecuencias en las propiedades físicas de los oligosacáridos y su uso como ingredientes alimenticios, también influyen en el destino que tendrán en el tracto intestinal. Una de las características de los oligosacáridos, una vez que han sido ingeridos es su relativa resistencia a la digestión por las enzimas hidrolíticas secretadas en el intestino (α -glucosidasa, maltasa e isomaltasa) y que depende del grado de polimerización (Delzenne, 2003). Una vez que los oligosacáridos llegan al colon, son hidrolizados a pequeños oligómeros o monómeros que son metabolizados por las bacterias intestinales y utilizados como fuente de energía para su crecimiento, produciendo gases (H_2 , CO_2 , CH_4) y ácidos orgánicos pequeños (Delzenne y Roberfroid, 1994).

Tabla 1. Oligosacáridos comerciales no digeribles

Oligosacárido	Tipo de enlace	Nombre comercial	Origen
Fructooligosacáridos	β 1,2	Raftiline (inulina y oligofruetosa)	Raíz de achicoria, cebolla, ajo
Galactooligosacáridos	β 1,4 y 1,6	Oligomate 55 (galactooligosacáridos) Cup Oligo (galactotriosa)	Síntesis enzimática a partir de lactosa
Isomaltooligosacáridos	α 1,6	Isomalto-900 Panorup	Hidrólisis enzimática del maíz y almidón
Xilooligosacáridos	α 1,6		Hidrólisis enzimática del xilano extraído de las mazorcas.

La ingesta de algunos oligosacáridos permite la proliferación de ciertos tipos de bacterias que son consideradas benéficas (bifidobacterias y lactobacilos) por la capacidad que tienen éstas de disminuir la cantidad de bacterias dañinas (Delzenne, 2003). Estudios en humanos han mostrado un incremento en las bifidobacterias como resultado del consumo

de oligosacáridos, así como una reducción en el número de bacterias dañinas como *Clostridium perfringens*. La ingesta de 2-10 g de oligosacáridos/día por algunas semanas incrementa efectivamente la población de bifidobacterias en el intestino en un promedio de 7.5 veces y disminuye el número de *C. perfringens* en un 81%; con algunos oligosacáridos, los lactobacilos se incrementan de 2 a 3 veces y *C. perfringens* disminuye de 0.5 a 0.6 veces. En estudios con humanos o *in vitro* (con heces fecales), se ha mostrado la reducción de metabolitos tóxicos mediante oligosacáridos. La ingesta de 3-6 g/día o la adición equivalente de oligosacáridos al cultivo *in vitro* reduce la producción de compuestos tóxicos y enzimas perjudiciales en un promedio de 44.6% y 40.9% respectivamente en alrededor de 3 semanas. La ingesta de oligosacáridos previene las diarreas autógenas o patogénicas mediante la reducción del número de bacterias dañinas. Por ejemplo, la ingesta de 8 g/día de fructooligosacáridos (FOS) por pacientes de 6 años redujo el número de deposiciones hasta el nivel normal en 8 días. El consumo de 3 g/día de una preparación que contiene 10×10^{10} células/g de *Bifidobacteria breve* por pacientes de edades entre 1 mes a 15 años con diarrea frecuente (causada por la administración de antibióticos) mejoró dramáticamente la frecuencia y apariencia de las deposiciones en un periodo de 3-7 días. Las dosis de oligosacáridos consideradas efectivas son de 3 g de fructooligosacáridos, 2-2.5 g de galactooligosacáridos, 2 g de oligosacáridos derivados de la soya y 0.7 g de xilooligosacáridos (XOS). Las dosis máximas (que no causan diarrea) de oligosacáridos derivados de la soya son de 0.64 g/kg para los hombres y de 0.96 g/kg para las mujeres, y las dosis mínimas para inducir diarrea con FOS es de 44 g para hombres y 49 g para mujeres. La toxicidad de los galactooligosacáridos (GOS) es $LD_{50} > 15$ g/kg en ratas; las pruebas para la toxicidad crónica mostraron que la administración continua de dosis de 4 g/kg por 35 y 180 días fueron seguras. Los estudios para toxicidad de los FOS en ratas revelaron que no existen efectos significativos para dosis por arriba de 2.17 g/(kg día). Los beneficios sobre la salud de los oligosacáridos pueden parecerse a los atribuidos a la fibra dietética, sin embargo las ventajas que los oligosacáridos tienen sobre ésta son que se requieren en cantidades más pequeñas (usualmente 3 g/día), no causan diarrea en las dosis recomendada, son ligeramente dulces, no tienen mal sabor, son completamente solubles en agua y son fáciles de incorporar en alimentos procesados (Tomomatsu, 1994).

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

2.1.2.1 Fructooligosacáridos (FOS)

Los FOS son producidos a partir de la hidrólisis parcial de la inulina extraída de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) por acción de enzimas fúngicas. La inulina es un oligómero de la fructosa presente en muchas plantas, como la cebolla, y el ajo. Este azúcar consiste en un polímero de D-fructosa unido por enlaces $\beta(2-1)$ con una D-glucosa unida al extremo terminal de la molécula por enlaces $\alpha(1-2)$. El grado de polimerización de la inulina puede variar de 2 a 60. Esta sustancia tiene probada resistencia a las propiedades degradativas del tracto intestinal y alcanza el colon en forma intacta. Es ahí, en donde sirve como sustrato para el crecimiento de la microflora colónica (Wang y Gibson, 1993). Otro método de obtención es la síntesis a partir de sacarosa usando la enzima transfructosilasa. Los FOS no son digeridos en el intestino delgado y son rápida y completamente fermentados por la microflora colónica a ácidos grasos de cadena corta (Escalante, 2001).

Los FOS poseen propiedades muy interesantes. Primero, su intensidad en dulzura es muy baja: cerca de una tercera parte de la intensidad de la sacarosa. Esta propiedad es altamente útil en alimentos en los cuales está restringido el uso de sacarosa debido a su alta dulzura. Segundo, los fructooligosacáridos no tienen un gran aporte calórico, ya que son escasamente hidrolizados por las enzimas digestivas lo que los hace poco disponibles como fuente de energía. Tercero, no pueden ser utilizados por *Streptococcus mutans* para formar caries dental. Y, finalmente, los fructooligosacáridos fomentan el

crecimiento de bifidobacterias y no fomentan el crecimiento de microorganismos putrefactores, que tienen tendencia a causar diarrea (Yun, 1996).

2.1.2.2 Galactooligosacáridos (GOS)

Los GOS son azúcares que se encuentran de forma natural en la leche de mamíferos y en algunos productos procesados en los que se pueden obtener mediante reacciones de transgalactosilación o por calentamiento excesivo de la leche. Una de las fuentes más ricas de oligosacáridos bioactivos es la leche humana, la cual juega un papel importante en la salud de los bebés que es atribuible en gran medida a la presencia de dichos azúcares. Por esta razón, desde hace muchos años se han realizado estudios para identificar y estudiar el efecto de los diferentes GOS. En las últimas cinco décadas se han realizado diversos estudios de los oligosacáridos presentes en la leche humana para establecer su composición estructural y se ha llegado a la conclusión de que están formados por seis residuos de monosacáridos: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico (Miller *et al.*, 1994).

La función biológica de los oligosacáridos presentes en la leche humana aún no se ha dilucidado del todo, sin embargo, se proponen dos posibles mecanismos: el primero, que previenen la adhesión de virus y bacterias en las células epiteliales; por ejemplo, los fucosil-oligogalactósidos son receptores de *Escherichia coli*, la lacto-N-tetraosa o lacto-N-neotrosa son receptores para *Streptococcus pneumoniae* y varios sialil-oligogalactósidos son receptores de *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae* y los virus de la influenza A, B y C. El segundo, que promueven el crecimiento de bacterias como *Bifidobacterium bifidus*, el cual es considerado como un microorganismo benéfico para la salud del humano (Nakhla *et al.*, 1999). Los oligosacáridos transgalactosilados no son hidrolizados o absorbidos en el intestino delgado y parece ser que son rápidamente fermentados en el colon proximal en donde se ha observado en estudios *in vivo* que su fermentación por bifidobacterias favorece la proliferación de las mismas (Escalante, 2001). La ingestión de GOS reduce la producción de ácidos biliares secundarios; estudios *in vitro* han mostrado que los estos compuestos son utilizados por cepas de

bifidobacterias y lactobacilos y además se ha sugerido que los GOS son utilizados de manera más rápida por las bifidobacterias que otros oligosacáridos como lactulosa y rafinosa (Gopal *et al.*, 2000). Los oligosacáridos transgalactosilados han sido producidos comercialmente para ser incorporados en productos como el Oligomate 55 que es el nombre comercial de un azúcar formado por la acción de la β -galactosidasa en la lactosa. El Oligomate 55 se utiliza ampliamente en un gran número de productos alimenticios como leches fermentadas, helados, bebidas frutales, galletas, dulces, edulcorantes, jaleas, carnes procesadas, entre otros. Consiste principalmente de GOS, en los cuales el principal componente es la 4'-galactosil-lactosa (Figura 1). Otros componentes son lactosa y monosacáridos (Boletín de Yakult).

El Oligomate 55 contiene al menos 55% de 4' y 6' GOS. Estos GOS son muy estables a altas temperaturas, permanecen sin cambios después de un tratamiento a 160°C por 10 minutos y un pH neutro y después de un tratamiento a 120°C por 10 minutos a pH 3 o 100°C por 10 minutos a pH 10. También permanecen estables durante periodos largos de almacenamiento. Por esto, se ha sugerido que los GOS son más estables que los FOS. En experimentos *in vitro* se ha mostrado que los GOS no se digieren y permanecen estables al contacto con la α -amilasa de la saliva, al contenido del intestino delgado de las ratas y a jugos gástricos humanos artificiales. Esto es porque los GOS (4'- y 6') tienen una configuración β y las enzimas intestinales son más específicas para enlaces glicosídicos α (Sako, *et al.*, 1999).

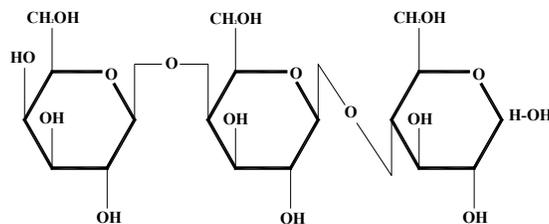


Figura 1. Estructura del 4'-galactosil-lactosa; componente principal de los galactooligosacáridos (Boletín de Yakult).

Se ha estudiado extensamente la utilización de los GOS por diversas bacterias intestinales. Sako *et al.* (1999) observaron que diversas bacterias pueden fermentar GOS (Tabla 2), encontrando que sólo algunas cepas de *Lactobacillus* pueden crecer con 4-galactosil-lactosa mientras que las bifidobacterias fueron el género más versátil al crecer prácticamente con todos los sustratos ya que producen enzimas glicolíticas que hidrolizan una amplia variedad de unidades monosacáridas, a diferencia de las bacterias intestinales como *Lactobacillus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus* cuya actividad enzimática es menos variada y más débil.

Tabla 2. Utilización de GOS por diversas bacterias intestinales. Crecimiento de las bacterias: (++) igual que en glucosa; (+) menos que en glucosa; (+-) poco crecimiento; (-) sin crecimiento.

	cepas probadas	glucosa	4-galactosil-lactosa	lactosa	lactulosa	rafinosa
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	7	++	++	++	++	++
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	6	++	++	++	++	-
<i>Bifidobacterium breve</i>	3	++	++	++	++	++
<i>Bifidobacterium infantis</i>	2	++	++	++	++	++
<i>Bifidobacterium longum</i>	8	++	++	++	++	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	++	+	++	++	-
<i>Lactobacillus casei</i>	2	++	-	+	++	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	++	-	++	++	+
<i>Lactobacillus salivarius</i>	2	++	-	++	++	++
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	++	++	++	++	+
<i>Bacteroides ovatus</i>	1	++	-	++	++	++
<i>Clostridium ramosum</i>	2	++	-	++	++	+
<i>Clostridium difficile</i>	1	++	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	3	++	-	++	++	+/-
<i>Escherichia coli</i>	6	++	-	+	+/-	-

2.1.2.3 Oligosacáridos derivados de la soya

Los oligosacáridos derivados de la soya, la rafinosa, la estaquiosa y la verbascosa (pentasacárido), son extraídos directamente de la misma. La capacidad de promover el crecimiento de bifidobacterias ha sido demostrada en humanos sanos, en donde se ha observado que la ingesta de 10 g/día de estos oligosacáridos incrementa significativamente los niveles de bifidobacterias durante el periodo de la ingesta. En un estudio en el que los humanos voluntarios recibieron 15 g de rafinosa/día durante cuatro semanas, se observó un incremento en el número de bifidobacterias y una disminución en el número de *Clostridium* y *Bacteroides* (Escalante, 2001).

2.1.3 Lactoferrina

Existen otros componentes de los alimentos que pueden ser considerados por su acción antimicrobiana, tal es el caso de la proteína de la leche lactoferrina o lactotransferrina, que estimula el desarrollo selectivo de bacterias probióticas en el tracto intestinal, lo cual ha llevado recientemente a definir esta proteína también como un prebiótico (Fox y Flynn, 1992).

Como su nombre lo indica, la lactoferrina fue aislada originalmente de la leche, en donde se encuentra en diversas concentraciones, ya que varía ampliamente de acuerdo a las diferentes especies y las diferentes etapas de lactancia. La lactoferrina comprende solo una pequeña porción, del 0.2 al 0.8% de las proteínas de la leche descremada, pero se encuentra en una proporción alta en el suero. En los adultos se detecta únicamente en las secreciones externas. La concentración en sangre es normalmente muy baja ($<1 \mu\text{g/mL}$) (Brock, 2002).

De acuerdo a estudios realizados, la lactoferrina de origen bovino tiene las siguientes características fisicoquímicas: peso molecular de 80,000 Da; 11.2% de carbohidratos; contenido máximo de hierro de 1.4 mg/g; punto isoeléctrico, 8.0; absorbancia a 465 nm de una solución saturada con hierro al 1%, 0.58. La molécula de lactoferrina contiene 4 glucanos unidos a átomos de nitrógeno y moléculas de azúcar como N-acetil lactosamina,

N-acetil glucosamina, galactosa, manosa y ácido neuramínico. La lactoferrina tiene un gran número de propiedades funcionales, y es utilizada en muchos productos comerciales como goma de mascar, fórmulas para infantes, comidas funcionales, especialidades veterinarias y productos para el cuidado personal como pasta de dientes. Las compañías que fabrican productos sugieren una dosis que varía de 10 a 300 mg por día. Esto se suma a los 100 a 125 mg de lactoferrina que los adultos consumen en productos lácteos diariamente. Las fuentes primarias de lactoferrina en la dieta son la leche, yogurt, queso entre otros. Los hidrolizados de lactoferrina tienen valor comercial como conservadores naturales en alimentos y cosméticos debido a su contenido de lactoferrina (Walzem *et al.*, 2002).

En general, las propiedades de la lactoferrina incluyen propiedades antibacterianas y antivirales, prevención del crecimiento de organismos patógenos en el intestino, estimulación del sistema inmune, regulación del metabolismo del hierro, y control del daño a tejidos o células. El efecto antimicrobiano está ligado a la actividad de unirse al hierro (Fe) ya que la lactoferrina al secuestrarlo no permite que esté disponible para el crecimiento bacteriano (Walzem *et al.*, 2002). La proteína proporciona cuatro ligandos en cada uno de los dominios; dos oxígenos de fenolato, un oxígeno del carboxilato y un nitrógeno del imidazol, que provienen de 2 tirosinas, 1 aspartato y 1 histidina. La construcción de cada sitio de unión para el Fe sugiere un mecanismo de unión y lanzamiento (Figura 2) y explica porque una gran variedad de iones metálicos pueden ser acomodados. El Fe se acomoda en la parte más profunda de la hendidura entre los dos dominios estructurales de la proteína. Detrás de él, corren dos ramas antiparalelas de la cadena polipeptídica, uniendo un dominio con el otro; flexionando estos dos esqueletos se permite la apertura de la hendidura para permitir el lanzamiento del Fe o para bloquear la salida de un Fe ya unido (Baker *et al.*, 1990).

La lactoferrina ha sido considerada como un componente importante en la defensa del huésped contra las infecciones microbianas. Aunque la actividad antimicrobiana de la lactoferrina es bien conocida, su mecanismo de acción no ha sido caracterizado completamente. El efecto antimicrobiano está ligado a la actividad de unirse al hierro ya

que la lactoferrina al secuestrarlo no permite que esté disponible para el crecimiento bacteriano. Investigaciones más recientes han encontrado que la proteína protege además la integridad de la mucosa intestinal (Walzem *et al.*, 2002). En estudios *in vitro* se ha mostrado que la lactoferrina bovina ejerce actividad antimicrobiana contra cepas de *E. coli*, y que esta misma lactoferrina hidrolizada ejerce un efecto más fuerte debido a la liberación del péptido llamado lactoferricina B. De acuerdo a los resultados obtenidos en estos estudios, la concentración más baja a la cual esta proteína causa la inhibición completa del crecimiento de *E. coli* es de 3 mg/mL en su forma normal, 0.1-0.2 mg/mL en su forma hidrolizada y 0.008-0.010 mg/mL cuando se utiliza la lactoferricina B (Shin *et al.*, 1998).

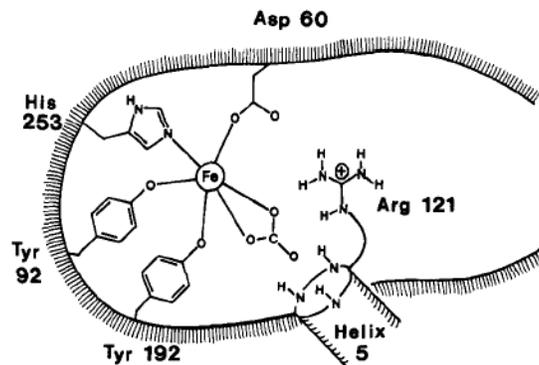


Figura 2. Diagrama del sitio de unión del anión y el Fe en la lactoferrina (Baker *et al.*, 1990).

2.2 Probióticos

Los probióticos se han definido como “organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al huésped mejorando el balance intestinal” (Simmering y Blaut, 2001). Al modificar la microflora intestinal, los probióticos influyen directa e indirectamente en el estado de la salud a través de producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos enteropatógenos (Lee y Salminen, 1995). Los criterios usados comúnmente para aislar y definir bacterias viables como bacterias probióticas incluyen los siguientes (Kailasaphaty y Chin, 2000):

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

Los microorganismos probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Tabla 3) y algunas levaduras con características probióticas semejantes. Las bifidobacterias son habitantes normales en el tracto intestinal, generalmente se encuentran en cantidades superiores a 10^{10} por cada gramo de contenido intestinal; comprenden cerca del 25% de la microflora, sin embargo, la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad (Hopkins *et al.*, 1998). Caracterizadas generalmente como gram-positivas, existen alrededor de 30 especies incluidas en el género *Bifidobacterium*, 10 de las cuales se aislaron de fuentes humanas (caries dental, heces fecales y vagina), 17 del tracto intestinal de rumiantes, 2 de agua de desecho y una de leche fermentada. Los lactobacilos son bacterias gram-positivas, son microorganismos anaerobios y estrictamente fermentativos. En la actualidad se conocen 56 especies del género *Lactobacillus* distribuidas en varios nichos ecológicos como son el tracto intestinal y el tracto genital y constituyen parte importante de la microflora endógena del humano. Su distribución se ve afectada por varios factores ambientales, los cuales incluyen pH,

disponibilidad de oxígeno, nivel de sustratos específicos presencia de secreciones e interacción bacteriana (Gomes y Malcata, 1999).

Tabla 3. Bacterias utilizadas como probióticos para consumo humano (Fooks et al., 1999)

Lactobacillus	Bifidobacterium	Streptococcus	Enterococcus
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>		<i>E. faecium</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. reuteri</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. casei</i> Shirota	<i>B. lactis</i>		
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. animalis</i>		
<i>L. paracasei</i>	<i>B. adolescentis</i>		
<i>L. jhonsonii</i>			

De entre las bacterias probióticas, existen algunas con una larga historia de probados beneficios en la salud humana como *Lactobacillus casei* Shirota, *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* entre otras. Las propiedades funcionales de algunas de estas cepas en particular se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas probióticas y sus propiedades funcionales (Holzapfel et al., 2001)

Propiedad	Lactobacillus casei Shirota	Lactobacillus rhamnosus	Lactobacillus johnsonii
Origen	Humano	Humano	Humano
Seguridad	Verificada	Verificada	Verificada
Estabilidad en ácido	Buena	Buena	Buena
Estabilidad en bilis	Resistente	Resistente	Resistente
Colonización	-	+	+
Producción de bacteriocinas	No	----	Sí
Adherencia (Caco-2)	No	Si	Sí
Adherencia (mucosa)	----	Sí	Sí

Entre los ejemplos anteriores encontramos a *L. casei* Shirota (Figura 3) que es una bacteria ácido láctica que se encuentra en muchos productos: verduras fermentadas, carne y productos de leche fermentada. Además se encuentra en el tracto intestinal y genital de animales y humanos. *L. casei* Shirota es una bacteria anaerobia ácido tolerante

con un metabolismo fermentativo estricto con el ácido láctico en mayores cantidades como producto final, puede ser utilizada ampliamente en la industria por sus propiedades probióticas como cultivos promotores de la salud (www.yakult.com). Metchnikof, sugirió que algunos de los síntomas del metabolismo intestinal enfermo podrían neutralizarse a través de *L. casei* Shirota utilizando como medio el yoghurt (Saloff-Coste, 1997).

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

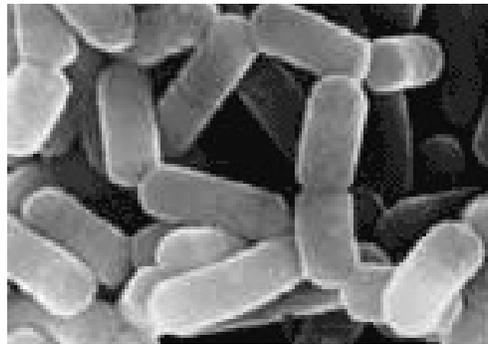


Figura 3. *Lactobacillus casei* Shirota (www.yakult.com)

2.2.1 Metabolismo de las bacterias lácticas

Los lactobacilos tienen requerimientos para su crecimiento muy complejos. Requieren bajos niveles de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas, un gran número de vitaminas del complejo B, ácidos grasos insaturados y minerales. Las bifidobacterias pueden crecer en medios semi-sintéticos que contengan sólo lactosa, tres aminoácidos libres (cisteína, glicina y triptofano), muchas vitaminas y nucleótidos, lo que contrasta con los grandes requerimientos nutricionales de los lactobacilos. Los lactobacilos fermentan glucosa a ácido láctico en el caso de una homofermentación, o producen cantidades

equimolares de ácido láctico y CO₂ en el caso de la heterofermentación (Gomes y Malcata, 1999). Las bacterias ácido lácticas producen ácidos grasos de cadena corta en diversas cantidades como productos metabólicos, los cuales ejercen acción antagónica contra otros organismos (Fooks *et al.*, 1999). Se ha sugerido que las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de eliminar bacterias patógenas al convivir estrechamente con ellas ya que producen sustancias antimicrobianas. La mayor parte de estas sustancias son ácidos orgánicos, especialmente láctico y acético. Pueden producir también peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono. Si las bacterias ácido lácticas están metabólicamente activas durante su paso a través de los intestinos, es muy probable que algunas de las sustancias mencionadas se produzcan. Algunos indicadores de esto provienen de la observación de que ciertas cepas probióticas reducen el pH de las heces fecales, lo que indica la producción de ácidos orgánicos. La producción de otros componentes antimicrobianos como diacetilo, ácido piroglutámico y bacteriocinas, no es muy común bajo condiciones *in vivo* (Ouwehand *et al.*, 1999).

2.2.2 Mecanismos de acción de los probióticos

Se puede decir que el mecanismo de acción de los probióticos es multifactorial y además, específico. La resistencia a la colonización y la acción directa sobre microorganismos patógenos es importante ya que reduce la duración de la diarrea. Las bacterias probióticas pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante la producción de sustancias inhibitoras (bacteriocinas), la reducción del pH intestinal mediante la producción de ácidos orgánicos (que pueden por si mismos eliminar a ciertos patógenos), además pueden competir por los nutrientes e incrementar la respuesta inmune (Tuohy *et al.*, 2003). Los mecanismos de acción de los probióticos pueden manifestarse de la siguiente manera (Escalante, 2001):

- Disminución en los síntomas de intolerancia a la lactosa, disminuyendo la concentración de la misma en leche fermentada por actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación y en el tracto intestinal.

- Disminución en la duración de diarrea en niños y adultos y disminución de infecciones intestinales mediante un efecto de barrera al evitar la colonización de la mucosa intestinal por bacterias potencialmente patógenas, además de la producción de compuestos antimicrobianos.
- Disminución en los síntomas de dermatitis atópica y alergia a alimentos.
- Efecto inmunopromotor y propiedades antitumorales.

Muchas evidencias han revelado que la prevención de la colonización del tracto intestinal por una gran variedad de microorganismos patógenos es el mecanismo primario de los efectos benéficos mediados por los probióticos. Las bacterias probióticas presentes en el tracto intestinal impiden la presencia de bacterias patógenas mediante la producción de sustancias inhibitoras (exclusión competitiva de patógenos). Estas sustancias incluyen bacteriocinas, ácido láctico y metabolitos tóxicos formados a partir del oxígeno (Figura 4) (Kaur *et al.*, 2002)

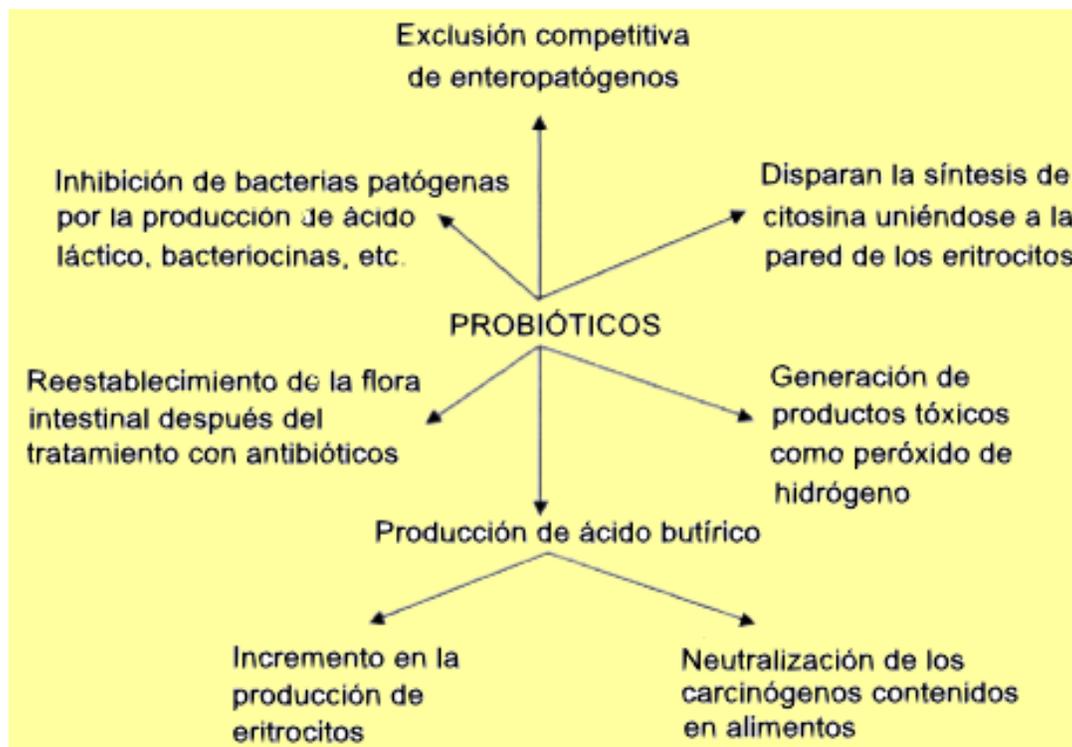


Figura 4. Mecanismos de acción de microorganismos probióticos (Kaur *et al.*, 2002)

2.2.2.1 Generación de compuestos inhibidores

La producción de ácidos orgánicos por las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasa-tiocianato, en el cual el peróxido de hidrógeno oxida el tiocianato para convertirlo en ácido hidrocianico que es perjudicial para los patógenos. El dióxido de carbono y el diacetilo sintetizado por las bacterias ácido lácticas inhiben el crecimiento de patógenos (Kailasapathy y Chin, 2000). Se ha reportado que los ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético y el ácido láctico poseen una alta actividad antimicrobiana. Estos ácidos pueden atravesar la membrana externa de las células por mecanismos de difusión y llevar protones al interior. El flujo de protones hacia el interior induce la acidificación del citoplasma y disipa el potencial de la membrana. Esto trae como consecuencia la pérdida de la fuerza motriz generada por los protones, e inhibe el transporte de sustratos provocando la muerte de la célula (Ogawa *et al.*, 2001).

2.2.2.2 Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas son definidas como proteínas biológicamente activas que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora. En la naturaleza existe una gran diversidad de este tipo de bacterias. En bacterias Gram-negativas han sido descritas diferentes tipos de bacteriocinas; las colicinas y las microcinas son las más reportadas. Las microcinas son péptidos pequeños que alcanzan un tamaño hasta de 10 kD. En cambio las colicinas son proteínas relativamente grandes. Las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas más extensamente estudiadas son las colicinas que son producidas por *E. coli*. La producción de colicina es mediada por la respuesta del sistema SOS (Sistema de reparación de emergencia del

DNA) y por esta razón es principalmente producida en condiciones de estrés. Sin embargo, las condiciones específicas ambientales también influyen en la producción de colicinas. La producción de la toxina es letal para la célula productora y cualquier célula vecina reconocida por esa colicina. Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son abundantes y más diversas que aquellas descritas a la fecha en las bacterias Gram-negativas. Estas difieren de las bacteriocinas Gram-negativas en dos aspectos fundamentales. Primero, la producción de bacteriocinas no es necesariamente el evento letal como ocurre en bacterias Gram-negativas. Esta diferencia crítica se debe a que las bacterias Gram-positivas poseen mecanismos de transporte para la liberación de la bacteriocina. En segundo término, las bacterias Gram-positivas han desarrollado una forma de regulación más compleja que el de las bacterias Gram-negativas. Además las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas son en su mayoría péptidos (Riley y Wertz, 2002).

La producción de bacteriocinas por bacterias Gram-positivas, en especial por bacterias probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*) es una característica benéfica que puede contribuir a la resistencia a la colonización y a la protección del huésped contra patógenos gastrointestinales. Por ejemplo, la cepa productora de bacteriocinas *L. acidophilus* IBB 801 muestra actividad antibacteriana contra *E. coli* y *Salmonella*. De igual forma, la cepa de *L. gasseri* K7 aislada de heces fecales de bebés de una semana de edad produce una bacteriocina que tiene actividad contra algunas cepas de *Clostridium* incluyendo *C. difficile* y *C. perfringens* (Avonts *et al.*, 2004). Se sabe que numerosas bacteriocinas como acidofilina, lactobacilina, acidolina, lactocidina y lactolina han mostrado acción antagónica contra los patógenos (Kailasapathy y Chin, 2000). Sin embargo se han realizado pocos estudios experimentales sobre la función de las bacteriocinas, y sus resultados no han sido del todo concluyentes. Se piensa que las bacteriocinas podrían servir como antagonistas que impiden o limitan la invasión de una cepa dentro de una comunidad microbiana establecida. Cuando las fuentes de nutrientes son limitadas las células productoras lisan a las células sensibles y enriquecen de nutrientes al medio ambiente local (Riley y Wertz, 2002).

Las bacteriocinas son producidas por casi todos los géneros de bacterias lácticas (Tabla 5) y pueden dividirse en tres clases (González *et al.*, 2003):

Clase I (Lantibióticos)

Péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina. Con base a las características estructurales y su modo de acción, los lantibióticos han sido subdivididos en dos grupos: A y B. Los lantibióticos tipo A inhiben a las células sensibles por despolarización de la membrana citoplasmática. Los lantibióticos de tipo B funcionan a través de inhibición enzimática.

Clase II (No lantibióticos)

Son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

- Clase IIa que es el grupo más grande y sus miembros se distinguen por tener una secuencia amino terminal conservada (YGNGVXaaC) y una actividad compartida contra *Listeria*.
- Clase IIb las cuales actúan a través de la formación de poros en las membranas de sus células blanco mediante dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
- Clase IIc formada por péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III

Son péptidos grandes mayores de 30 kDa y sensibles al calor, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

Tabla 5. Bacteriocinas y microorganismos productores (González *et al.*, 2003)

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subespecie lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis subespecie cremoris</i>
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

2.2.3 Estudios con microorganismos probióticos

Las investigaciones con probióticos en animales, humanos (Tabla 6) e *in vitro* (Tabla 7) se han enfocado a una gran cantidad de efectos como son: hipocolesterolémicos (disminuir concentraciones de colesterol en sangre), antimicrobianos e inmunomodulantes, así como en su papel en la prevención del cáncer de colon a través de un consumo regular dando un acercamiento alternativo para asegurar el mantenimiento bacteriano adecuado necesario para obtener el efecto probiótico que se desea (Saloff-Coste, 1997).

Estudios *in vivo* con animales y humanos voluntarios, han demostrado que el consumo de bifidobacterias tiene un efecto en la microflora del intestino. Cepas seleccionadas sobreviven al estómago y al tránsito intestinal y llegan al colon en un número abundante. La microflora intestinal es modificada subsecuentemente, como se ha medido en forma directa por ensayos de numeración fecal y enzimática, o indirectamente por la evaluación del tránsito intestinal (Saloff-Coste, 1997). Por otra parte, se han realizado diversos

estudios *in vitro* con microorganismos probióticos, en la Tabla 7 se resumen las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos en tales estudios.

Tabla 6. Efectos de probióticos en estudios clínicos en humanos (Ouwehand *et al.*, 1999 y Ouwehand *et al.*, 2002).

Género	Especie	Cepa	Efecto clínico en humanos
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	GG	Adherencia a las células intestinales, estimulación de la respuesta inmune, prevención de la diarrea patogénica. Disminución de la diarrea por rotavirus. Disminución de los síntomas de inflamación en el colon.
	<i>johnsonii</i>		Prevención de la diarrea del viajero, modulación de la flora intestinal, alivio de la intolerancia a la lactosa.
	<i>plantarum</i>	299v	Disminución del síndrome de colon irritable. Reducción del colesterol LDL. Adherencia a las células intestinales humanas, modulación de la flora intestinal
	<i>reuteri</i>	SD2112	Reducción en el tiempo de duración de la diarrea por rotavirus. Colonización del tracto intestinal.
	<i>salivarius</i>	UCC118	Reducción en los síntomas debidos a la inflamación del colon.
	<i>bulgaricus</i>		Reduce o elimina los síntomas de intolerancia a la lactosa.
	<i>acidophilus</i>		Inhibición de bacterias patógenas, adhesión a las células intestinales humanas.
	<i>casei</i>	Shirota	Modulación de la flora intestinal, efectos positivos en tratamientos contra el cáncer, disminución de la actividad enzimática en las heces fecales.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>		Prevención de la diarrea del viajero, tratamiento contra la diarrea viral incluyendo rotavirus, modulación de la respuesta inmune.
	<i>lactis</i>	Bb12	Tratamiento de alergias. Disminución de la diarrea por rotavirus. Reducción de la incidencia de la diarrea del viajero.
	<i>longum</i>		Exclusión competitiva de <i>Escherichia coli</i> , inhibición de <i>E. coli</i> de la superficie de la mucosa intestinal humana.
	<i>bifidum</i>		Reduce la duración de la diarrea y aumenta la respuesta inmunológica.
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	boulardi	Prevención de la diarrea causada por antibióticos, tratamiento contra la colitis causada por <i>Clostridium difficile</i> .

Tabla 7. Estudios *in vitro* con microorganismos probióticos.

Estudio	Desarrollo y resultados
<p>Estudio <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (bebida comercial Yakult) contra organismos que causan diarrea (Consignado <i>et al.</i>, 1993).</p>	<p>Se determinó la actividad antibacteriana y el tiempo efectivo de contacto de <i>L. casei</i> Shirota contra <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella enteritidis</i>, <i>Shigella dysenteriae</i> y <i>Vibrio cholerae</i>. Se mezclaron cantidades iguales de Yakult y de los organismos de prueba. Se transfirieron 10 mL a una caja Petri para medir el tiempo de contacto 0 y se incubaron a 35°C por 18-24 h. El procedimiento se repitió en intervalos de 5 minutos durante 1 hora. El número de colonias al tiempo 0 fue de 4.50 log₁₀ (ufc/mL). Después de 5 min de tiempo de contacto, se presentó una reducción mayor al 50% en el número de ufc/mL para todos los microorganismos patógenos probados. En 60 min de tiempo de contacto, las colonias finales fueron menores al 5% para <i>E. coli</i>, menos del 10% para <i>S. enteritidis</i> y <i>S. dysenteriae</i>.</p>
<p>Inhibición <i>in vitro</i> de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 por cepas probióticas de <i>Lactobacillus</i> debido a la producción de ácido láctico (Ogawa <i>et al.</i>, 2001)</p>	<p>Se estudiaron las características con las cuales las bacterias láctica <i>L. casei</i> Shirota y <i>L. acidophilus</i> son capaces de inhibir a microorganismos patógenos. Se utilizaron sistemas de fermentación en lote en los cuales se midió el efecto inhibitorio mediante la co-incubación de la cepa patógena (<i>E. coli</i>) con cada cepa de <i>Lactobacillus</i>. Las cantidades inoculadas fueron de 9 log₁₀(ufc/mL) para <i>L. casei</i> Shirota y 8 log₁₀ (ufc/mL) para <i>L. acidophilus</i> y <i>L. brevis</i> y de 7 log₁₀(ufc)/mL para <i>E. coli</i>. Se midió el pH de los sobrenadantes obtenidos del medio de cultivo (por litro): extracto de levadura, 5 g; triptosa, 3 g; K₂HPO₄•3H₂O, 3.9 g; KH₂PO₄, 3 g; citrato de amonio, 2 g; MgSO₄•7H₂O, 0.58 g; MnSO₄•2H₂O, 0.12 g; Tween 80, 1 g; glucosa, 15 g; ajustando el pH a 7.1) y el número de ufc/mL para conocer el efecto del ácido láctico sobre <i>E. coli</i>. De acuerdo a los resultados obtenidos, el número de ufc/mL de <i>E. coli</i> disminuye al ser cultivado con <i>L. casei</i> Shirota de 7 log₁₀(ufc/mL) hasta 0 en 24 h y de 7 hasta 0 en 12 h cuando se crece con <i>L. acidophilus</i>, mientras que cuando se crece con <i>L. brevis</i>, su número permanece constante. El pH del medio de cultivo tiene efecto sobre el crecimiento de la bacteria patógena ya que la concentración de 70 mM de ácido láctico (pH 3.8) es suficiente para inhibir el crecimiento de <i>E. coli</i>.</p>

Tabla 7 (continuación). Estudios in vitro con microorganismos probióticos.

Estudio	Desarrollo y resultados	
Influencia del medio de crecimiento en la producción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y bacteriocinas por cepas de <i>Lactobacillus</i> (Zalán <i>et al.</i> 2005)	Se investigó el efecto inhibitorio de las bacteriocinas y la producción de peróxido de hidrógeno de cepas de bacterias ácido lácticas (<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. casei</i> subespecie <i>pseudoplantarum</i>). Para probar como la concentración de H ₂ O ₂ y la producción de bacteriocinas pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos se inocularon cajas con agar suave con una concentración de 10 ⁴ ufc/mL y posteriormente se realizaron pozos que se llenaron con 150 µL del extracto crudo de bacteriocinas y 150 µL de medio con H ₂ O ₂ . Las cajas se incubaron a 30-37°C por 18 h para posteriormente medir el ancho de la zona de inhibición expresado en mm como una diferencia en el radio. Los resultados se muestran a continuación.	
Cepa	Bacteriocinas	Bacteriocinas + H₂O₂
Radio (mm)	Radio (mm)	
Control (sin microorganismo)	2.7723	3.4360
<i>L. plantarum</i>	2.6643	3.6413
<i>L. curvatus</i>	2.6993	3.4716
<i>L. casei</i>	2.8690	2.7723
Potencial probiótico de cepas <i>Lactobacillus</i> aisladas de productos de consumo diario (Maragkoudakis <i>et al.</i> , 2005).	Se examinó la resistencia de 29 cepas de lactobacilos (entre ellas <i>L. casei</i> Shirota) en ambientes a bajos pH. Los cultivos fueron suspendidos en soluciones con pH 1y pH 3. Las poblaciones iniciales se encontraban entre 7 y 9 log ₁₀ (ufc)/mL. La resistencia se midió en términos de las ufc obtenidas después de la incubación a 37 °C de las muestras tomadas a 0, 1 y 3 h, reflejando el tiempo que la comida permanece en el estómago. De acuerdo a los resultados, todas las cepas utilizadas mantuvieron su viabilidad después de 3 h a un pH de 3. Las cepas fueron probadas también para estudiar su actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> . Los sobrenadantes de los cultivos de lactobacilos se ajustaron a un pH de 6.5 y 4.5. La actividad se midió utilizando la técnica de difusión en pozos. Los resultados mostraron que ninguno de los sobrenadantes a 6.5 inhibió el crecimiento de la bacteria patógena, mientras que a pH de 4.5 si hubo inhibición de <i>E. coli</i> .	

2.3 Simbióticos

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

Existe evidencia científica de que algunos compuestos prebióticos promueven el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en el colon (Kneifel, *et al.*, 2000). Se ha reportado que muchos oligosacáridos poseen actividad prebiótica, estos datos se obtienen siempre de estudios en los que el oligosacárido es comparado con un placebo en estudios *in vitro* o en estudios con humanos; en un estudio en el que se monitorea por 24 horas el crecimiento de diferentes bacterias probióticas en diferentes prebióticos, se obtuvo que todos los prebióticos utilizados incrementaron el número de bifidobacterias y lactobacilos. Los XOS y la lactulosa incrementan el número de bifidobacterias, mientras que los FOS producen las poblaciones más altas de lactobacilos. Durante los últimos años, se han realizado esfuerzos para desarrollar preparaciones o alimentos funcionales que contengan pro- y prebióticos. Combinando estos dos componentes en productos

llamados simbióticos, se espera obtener un efecto doblemente positivo sobre la microflora intestinal (Kneifel *et al.*, 2002). Las especies objetivo en la mayoría de las intervenciones dietéticas son las bifidobacterias y los lactobacilos y en los estudios (Tabla 8) se ha confirmado que los prebióticos son un instrumento útil en la manipulación de la microflora colónica.

Tabla 8. Estudios probióticos utilizando prebióticos como sustrato

Estudio	Desarrollo y resultados
Fermentación <i>in vitro</i> de oligofruktosa e inulina por bacterias que crecen en el intestino grueso humano (Wang y Gibson, 1993)	Se comparó la fermentación <i>in vitro</i> de la oligofruktosa y la inulina con carbohidratos de referencia mediante la medición de los productos finales formados en un cultivo en lote. Los datos sobre crecimiento bacteriano mostraron que la oligofruktosa y la inulina ejercieron un efecto estimulante preferencial sobre los géneros de <i>Bifidobacterium</i> , mientras que mantienen las poblaciones de patógenos potenciales (<i>E. coli</i> y <i>Clostridium</i>) en niveles bajos. Los estudios con cultivos puros mostraron un aumento en la actividad de las bifidobacterias al consumir estos sustratos en comparación con la glucosa.
Selección de bidobacterias y lactobacilos en un cultivo continuo utilizando FOS como sustrato selectivo (Sghir <i>et al.</i> , 1998).	Este experimento se diseñó para seleccionar bacterias del colon humano utilizando un cultivo continuo con FOS como fuente primaria de carbono y energía. Se siguieron los cambios en las poblaciones de bacterias ácido lácticas (condiciones anaerobias, con un medio que contenía 5 g de FOS/L) durante un periodo de 21 días. La cuenta bacteriana mostró que la proporción total de la cuenta representada por bifidobacterias y lactobacilos se incremento del 1.9% en el día 1 a 98.1% en el día 21. Las bifidobacterias mantuvieron niveles de entre 10-20% de la población total en los primeros 6 días mientras que los niveles de lactobacilos estuvieron bajos; después de los 9 días, la población de lactobacilos alcanzó niveles altos (20-42%) permaneciendo así hasta el día 21. Las observaciones obtenidas mostraron que los lactobacilos son capaces de utilizar los FOS.

Tabla 8 (continuación). Estudios con probióticos utilizando prebióticos como sustrato

Estudio	Desarrollo y resultados																																						
<p>Influencia de una mezcla simbiótica (<i>Lactobacillus acidophilus</i> y fructooligosacáridos) en un reactor de Simulación del Ecosistema Microbiano Intestinal Humano (Gmeiner <i>et al.</i>, 2000)</p>	<p>Se utilizaron reactores simulando las diferentes partes del tracto intestinal humano en el siguiente orden: estómago, duodeno, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente, de acuerdo con lo descrito por Molly <i>et al.</i> (1993). La microflora consistió de una mezcla de bacterias de origen humano. La temperatura se mantuvo a 37°C. El pH fue controlado entre 5.5 y 6.0, 6.0 y 6.4 y 6.4 y 6.8 para cada parte del intestino. El objetivo del estudio fue monitorear los cambios en la densidad de la población de bacterias en el intestino durante la administración de <i>L. acidophilus</i> y un fructooligosacárido. En el periodo durante el cual se administró la mezcla simbiótica, la estimulación en el crecimiento de las bifidobacterias fue notable (la cuenta promedio se elevó 10 veces). Por otra parte, el crecimiento de <i>E. coli</i> y otras bacterias dañinas fue inhibido. Sin embargo, se observó un incremento en el género <i>Clostridium</i> lo que podría indicar cierto potencial de estas bacterias para crecer en prebióticos.</p>																																						
<p>Evaluación comparativa <i>in vitro</i> de las propiedades fermentativas de oligosacáridos prebióticos (Rycroft <i>et al.</i>, 2001).</p>	<p>Este estudio comparó la fermentación <i>in vitro</i> de algunos prebióticos por bacterias intestinales. Se realizaron cultivos en lote utilizando una concentración de oligosacáridos de 1% p/v y ajustando el pH del medio de cultivo a 7. Se tomaron muestras después de 5 horas de iniciada la fermentación para determinar el efecto inmediato de los oligosacáridos y después de 24 horas para observar el efecto final sobre la población bacteriana obteniéndose los siguientes resultados:</p> <table border="1" data-bbox="540 1318 1399 1528"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Grupo</th> <th rowspan="2">Inóculo log₁₀ (ufc)/g heces</th> <th colspan="2">FOS</th> <th colspan="2">Inulina</th> <th colspan="2">GOS</th> </tr> <tr> <th>5 h</th> <th>24 h</th> <th>5 h</th> <th>24 h</th> <th>5</th> <th>24</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Bifidobacterias</td> <td>9.61</td> <td>10.28</td> <td>10.23</td> <td>10.20</td> <td>10.06</td> <td>10.33</td> <td>10.33</td> </tr> <tr> <td>Lactobacilos</td> <td>9.08</td> <td>9.52</td> <td>9.07</td> <td>9.02</td> <td>9.06</td> <td>9.03</td> <td>8.70</td> </tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td> <td>8.25</td> <td>8.57</td> <td>8.49</td> <td>8.86</td> <td>8.78</td> <td>8.52</td> <td>8.10</td> </tr> </tbody> </table> <p>De acuerdo a estos resultados, con todos los prebióticos, las poblaciones de bifidobacterias se ven incrementados de manera significativa, mientras que los cambios en los lactobacilos son menos pronunciados y más variables, llegando incluso a disminuir en el número de ufc con respecto al inóculo inicial, sin embargo, esta diferencia no llega a ser significativa. El mismo efecto se observa en el caso de <i>E. coli</i>.</p>	Grupo	Inóculo log ₁₀ (ufc)/g heces	FOS		Inulina		GOS		5 h	24 h	5 h	24 h	5	24	Bifidobacterias	9.61	10.28	10.23	10.20	10.06	10.33	10.33	Lactobacilos	9.08	9.52	9.07	9.02	9.06	9.03	8.70	<i>E. coli</i>	8.25	8.57	8.49	8.86	8.78	8.52	8.10
Grupo	Inóculo log ₁₀ (ufc)/g heces			FOS		Inulina		GOS																															
		5 h	24 h	5 h	24 h	5	24																																
Bifidobacterias	9.61	10.28	10.23	10.20	10.06	10.33	10.33																																
Lactobacilos	9.08	9.52	9.07	9.02	9.06	9.03	8.70																																
<i>E. coli</i>	8.25	8.57	8.49	8.86	8.78	8.52	8.10																																

Tabla 8 (continuación). Estudios con probióticos utilizando prebióticos como sustrato.

Estudio	Desarrollo y resultados							
Investigaciones del efecto <i>in vitro</i> de probióticos y prebióticos en patógenos intestinales humanos (Fooks y Gibson, 2002).	En este estudio se investigaron los efectos de microorganismos probióticos, en combinación con prebióticos sobre ciertos patógenos intestinales. Se observó que los probióticos crecidos en diferentes fuentes de carbono inhibieron el crecimiento de <i>E. coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> , sin embargo, el grado de inhibición varía con la fuente de carbono proporcionada. Cada probiótico se probó en combinación con una serie de prebióticos para obtener los diámetros de los halos de inhibición. Se realizaron dos pruebas, una con el sobrenadante sin ajustar el pH final y otra ajustando el pH a 7; ambas se realizaron mediante la técnica de difusión en pozos. Se presentan únicamente los resultados (radio de inhibición en mm) obtenidos para la inhibición de <i>E. coli</i> :							
		<i>L. plantarum</i>			<i>L. pentosus 905</i>			
		Sin ajuste	pH	pH 7	Sin ajuste	pH	pH 7	
	<i>E. coli</i>	FOS	8	4,29	2.5	5	4.35	4
		Inulina	7.5	4,52	5	12	4.77	2.5
		XOS	9.5	4.92	0.5	9.5	4.83	---
		FOS:XOS	5.5	4.78	3.5	5.5	4.63	2
	En estos resultados se observa además de la producción de compuestos inhibidores, el efecto del pH sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> ya que cuando la prueba se realiza sin ajustar el pH del sobrenadante, el halo de inhibición es mayor y disminuye drásticamente cuando el pH se ajusta a 7. De esta forma en un experimento para determinar el efecto del pH sobre el número de ufc, se observa que para un pH de 7, no hay efecto alguno en el número de microorganismos patógenos ya que su población aumenta en 24 h de 7 a 10 log ₁₀ (ufc)/mL; mientras que es hasta que se alcanza un pH de 4 que se evita el crecimiento de <i>E. coli</i> que permanece en 7-7.4 log ₁₀ (ufc)/mL.							

2.4 Aparato digestivo

El aparato digestivo (Figura 5) suministra al organismo un aporte continuo de agua, electrolitos y nutrientes. Para ello, son necesarios: 1) movimiento de alimentación a través del tubo digestivo; 2) secreción de jugos digestivos y digestión de los alimentos; 3) absorción de los productos digestivos, del agua y de los diversos electrolitos; 4)

circulación de la sangre por los órganos intestinales para retirar las sustancias absorbidas, y 5) control de todas esas funciones por los sistemas nervioso y hormonal. Cada parte se adapta a sus funciones especiales, algunas de simple paso de alimento, tales como el esófago, otras de almacenamiento, como el estómago, y otras para su digestión y absorción, como los intestinos (Guyton, 1992).

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

Boca

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

Esófago

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

Estómago

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

Intestino delgado

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

Intestino grueso

Es la parte final del tubo digestivo, mide aproximadamente 1.5 metros de longitud. Se divide en varias partes: ciego (donde desemboca el intestino delgado), colon (ascendente, transversal y descendente) y recto/ano (parte final del tubo digestivo por la que se eliminan los residuos alimentarios en forma de heces). La función fundamental del intestino grueso es absorber el abundante líquido que llega hasta aquí, con lo que ayuda a dar consistencia a las heces (desechos de la alimentación no absorbidos). En segundo lugar el recto cumple la función de almacenar las heces hasta el momento en que se realice la defecación (www.saludalia.com).

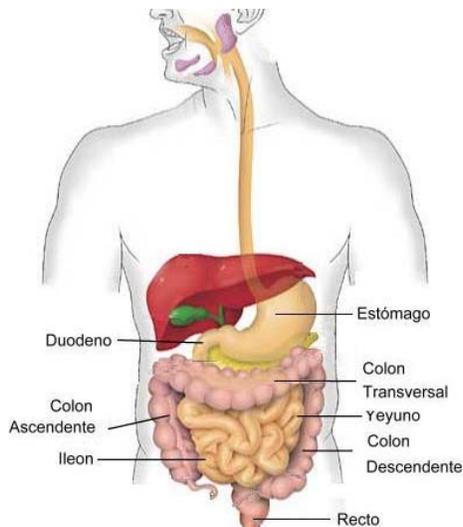


Figura 5. Aparato Digestivo Humano (www.saludalia.com)

2.5 Microflora intestinal

El intestino de los seres humanos es un ecosistema microbiano de una gran diversidad (Figura 6). Existen al menos de 400 a 500 especies de bacterias presentes en la flora fecal humana, con concentraciones de hasta 10^{11} microorganismos por gramo de heces. La flora intestinal endógena contiene unas 10^{14} bacterias, es decir 10 veces más que la suma de todas las células del cuerpo humano. Las bacterias exógenas, una vez que han sido ingeridas, circulan por el intestino y constituyen la flora transitoria (Danone, 2002).

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

Las poblaciones de bacterias en el tracto intestinal difieren de sección en sección debido a que las condiciones ambientales cambian a lo largo de esta ruta. En sujetos saludables el estómago y el duodeno están poblados de manera escasa (10^1 y 10^3 células/mL) porque la secreción de HCl dentro del estómago genera un pH de 2 en el mismo. La densidad bacteriana se incrementa en las partes más distantes del intestino delgado (10^4 a 10^8) alcanzando una concentración máxima por encima de 10^{12} células/g de contenido en el colon. Los grupos de bacterias que se encuentran en cada una de las secciones del tracto intestinal difieren entre ellos con respecto a su diversidad y su importancia numérica y puede asumirse que están adaptadas de manera óptima a las condiciones que prevalecen en su respectiva sección (Blaut, 2002).

La función primaria de la microflora intestinal es reforzar la función de barrera en las superficies mucosas. El epitelio de ésta superficie es una interfase que esta en contacto con el ambiente externo. A través de la dieta y la exposición al ambiente esta superficie

esta en contacto continuo con microorganismos potencialmente patógenos así como con antígenos externos que provienen de la dieta. Las bacterias previenen la adhesión de estos microorganismos patógenos y la entrada de alérgenos a través de mecanismos variados. Las bacterias benéficas previenen la invasión y colonización por otros microorganismos a través del desplazamiento físico, compitiendo literalmente por el espacio en la superficie epitelial. Las colonias de bacterias endógenas forman densas capas en las paredes del colon, manteniendo las proteínas alérgicas de los alimentos no digeridos y los microorganismos patógenos lejos de las células epiteliales. Las bacterias benéficas pueden competir con los patógenos por los nutrientes. Si las bacterias benéficas predominan, son capaces de prevenir el uso de nutrientes por bacterias patógenas, que entonces no serán capaces de sobrevivir. Estas bacterias benéficas utilizan carbohidratos como nutrientes y producen a partir de estos, ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta que incluyen propionato, butirato y acetato. En consecuencia, en la superficie epitelial se mantiene un pH bajo (ácido) que es inhibitorio para las bacterias patógenas, además, los ácidos grasos que producen, son fuentes de energía para las células epiteliales del colon. Las bacterias benéficas producen peróxido de hidrógeno que es un antagonista para bacterias patógenas y algunas levaduras. Además del efecto de barrera, las bacterias también pueden sintetizar nutrientes en el colon como vitamina B12, biotina y vitamina K (Rosenberg, 1999).

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

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

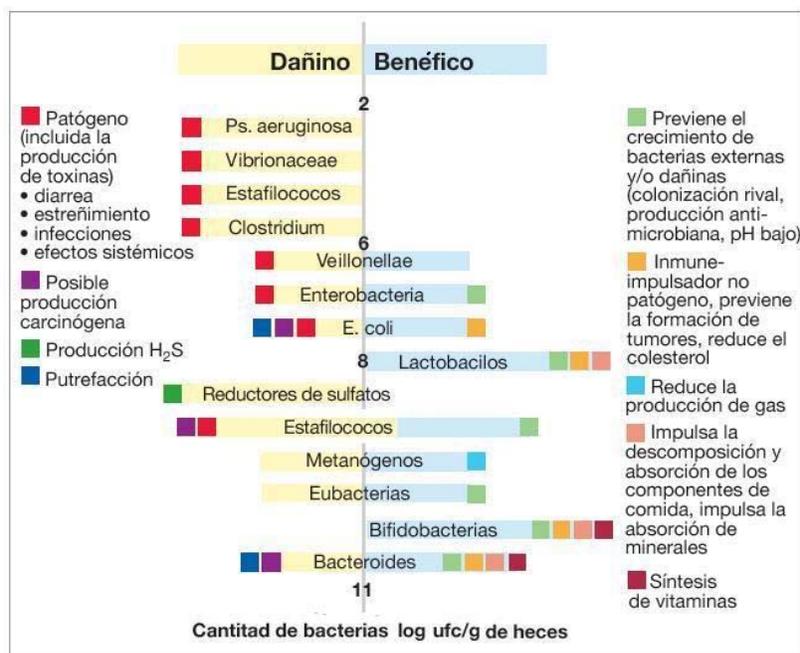


Figura 6. Microorganismos de la microflora intestinal humana (Saxelin, 2002)

2.6 Simulación *in vitro* del tracto intestinal

El interés por estudiar el comportamiento de las bacterias existentes en el aparato digestivo ha llevado a los investigadores a desarrollar diversos experimentos en los que se diseñan y desarrollan equipos que puedan simular cada una de sus regiones. De esta forma, existen varias simulaciones (Tabla 9) en las cuales, el diseño del simulador intestinal trata de asemejarse lo más posible a las condiciones existentes (temperatura, acidez, peristaltismo, tiempo de tránsito intestinal y condiciones nutricionales entre otras).

Tabla 9. Estudios de simulación in vitro del tracto intestinal humano

Simulación in vitro	Condiciones de simulación
<p><i>Desarrollo de un reactor multi-cámaras para la simulación del ecosistema microbiano intestinal humano.</i> (Molly et al., 1993)</p>	<p>El objetivo del estudio se divide en 2 partes: Primero, determinar si es posible mantener la diversidad de una comunidad microbiana en los intestinos delgado y grueso en un reactor de multi-cámaras por varias semanas. Segundo, evaluar los cambios en la composición de la dieta durante un periodo de 6 semanas que afectan la microflora. Se desarrolló un simulador de 5 cámaras (Figura 7) para el tracto intestinal humano; el intestino delgado consiste en dos vasos; y el grueso consiste en tres vasos. El reactor tuvo agitación constante (150 rpm), la temperatura fue de 37°C. El pH de los vasos 2, 3, 4 y 5 estuvo controlado entre 6.5 y 7.0, 5.5 y 6.0, 6.0 y 6.4 y 6.4 y 6.8 respectivamente. Los tiempos de residencia y volúmenes para cada una de las partes del tracto intestinal fueron los siguientes: Duodeno y yeyuno, 4h y 300 mL; ileon, 4 h y 300 mL, colon ascendente, 20h y 1000 mL; colon transverso, 32 h y 1600 mL y colon descendente, 24 h y 1200 mL. El medio utilizado en el experimento contenía (g/L: glucosa, 0.4; extracto de levadura, 3; proteosa-peptona, 1; mucina, 4; cisteína, 0.5; NaHCO₃, 0.4; NaCl, 0.08; K₂HPO₄, 0.04; KH₂PO₄, 0.04; CaCl₂, 0.008; MgSO₄•7H₂O, 0.008; haemina, 0.005; Tween 80, 1mL/L y una combinación de arabinogalactano, pectina, xilano y almidón en distintas proporciones. No se observaron diferencias significativas entre las poblaciones mantenidas y los datos obtenidos de estudios <i>in vivo</i>. No se observaron cambios en las poblaciones con las diferentes dietas probadas. El estudio concluye que el reactor puede considerarse una herramienta útil para el estudio de la composición y actividades de la flora microbiana en el intestino humano. Debido a la ausencia de absorción de metabolitos del fluido, el valor del simulador esta limitado al estudio de las principales interacciones en la comunidad microbiana. Debido a la ausencia de absorción de metabolitos del fluido, el valor del simulador esta limitado al estudio de las principales interacciones en la comunidad microbiana. Aún así, debido a la variedad de aditivos que pueden adicionarse (por ejemplo, sales biliares, probióticos, drogas) el reactor puede evaluar la influencia que estos tendrán en la flora humana.</p>

Tabla 9 (continuación). Estudios de simulación in vitro del tracto intestinal humano

Simulación in vitro	Condiciones de simulación
Validación de un sistema continuo de cultivo de tres etapas para el estudio del efecto del tiempo de retención en bacterias del colon humano. (Macfarlane et al, 1998)	El sistema consiste en tres recipientes V1, V2 y V3 (Figura 8) con pH de 5.5, 6.2 y 6.8 respectivamente. El medio (g/L: almidón,5; pectina, 2; goma guar, 1; mucina 4; xilano, 2, arabinogalactano, 2; inulina 1; caseína, 3; agua peptonada, 5; sales biliares No. 3, 0.4; extracto de levadura, 4.5; FeSO ₄ , 0.005; NaCl, 4.5; KCl, 4.5; KH ₂ PO ₄ , 0.5; CaCl ₂ , 0.15; MgSO ₄ , 1.25; NaHCO ₃ , 1.5; cisteína, 0.8; haemina, 0.005; Tween 80, 1., se alimentó con bombas peristálticas a cada uno de los fermentadores. El sistema reproduce temporal y fisicoquímicamente las características de la microbiota en el colon (ascendente, transverso y descendente), y fue validado en base a comparaciones de las mediciones químicas y microbiológicas con muestras de los contenidos intestinales humanos. Los resultados muestran que la mayor parte de los carbohidratos se degradan en el colon ascendente. Las correlaciones entre las mediciones químicas y bacteriológicas in vivo y los datos obtenidos in vitro mostraron que este sistema de tres etapas es un modelo útil para el estudio de la fisiología y ecología de los microorganismos del intestino grueso bajo diferentes condiciones. Una de las mayores ventajas de los sistemas in vitro es su flexibilidad, lo que permite la evaluación de una gran cantidad de reguladores de la actividad bacteriana como el pH, la disponibilidad de sustrato y las tasas de crecimiento de los microorganismos.

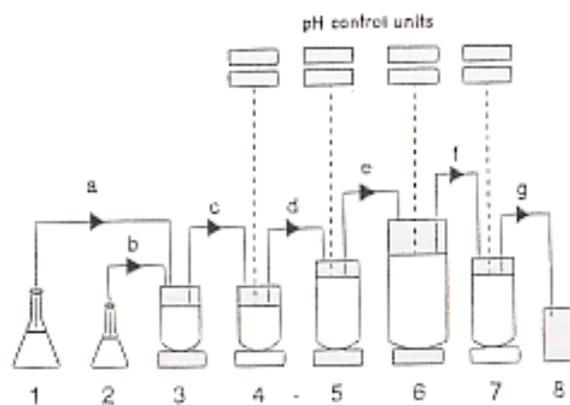


Figura 7. Simulación in vitro del tracto intestinal humano: 1, alimentación; 2, polvo pancreático; 3, duodeno y yeyuno; 4, ileon; 5 colon ascendente; 6, colon transverso; 7, colon descendente; 8, efluente. Bombas a-d operadas en semi-continuo; bombas e-g operadas en continuo. (Molly et al., 1993).

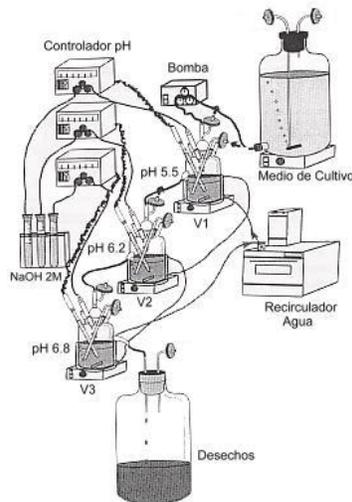


Figura 8. Sistema de cultivo continuo de tres etapas: V1, colon ascendente; V2, colon transverso; V3, colon descendente (Macfarlane *et al.*, 1998).

Este tipo de experimentos llevados a cabo en pequeños fermentadores inoculados con bacterias puras o mezclas de heces fecales y con variables como temperatura, pH y composición de nutrientes pueden ser controlados cuidadosamente y permiten el estudio y evaluación de pre- y probióticos. De esta forma se pueden simular los diferentes compartimientos del tracto intestinal, principalmente del colon, ya que aunque se sabe que la mayor parte del alimento es digerido en el estómago y el intestino delgado debido a las enzimas digestivas presentes, algunos de los componentes de los alimentos escapan a esta digestión y se convierten en sustratos disponibles para las bacterias colónicas que mediante diversos procesos metabólicos fermentan ese alimento y lo convierten en productos relevantes para la salud humana (van Loo *et al.*, 1999 y Priebe *et al.*, 2002).

Los experimentos se desarrollan generalmente con cultivos continuos en secuencias pero tienen una limitación y es que los metabolitos no son absorbidos o drenados de los fermentadores como sucede naturalmente en el colon por lo que la acumulación de estos productos afecta el equilibrio de los procesos bioquímicos (inhibición). No es posible cuantificar la influencia del ambiente artificial de estos biorreactores. Aún así, los estudios que se realizan pueden considerarse herramientas importantes (van Loo *et al.*, 1999).

3. OBJETIVO

Determinar el efecto de la lactoferrina y el Oligomate 55 en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli* en un sistema de simulación de diferentes regiones del tracto intestinal.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos prebióticos contenidos en el Oligomate 55 promoverán el crecimiento selectivo de *Lactobacillus casei* Shirota que en combinación con la lactoferrina inhibirán el crecimiento de *E. coli* en un sistema de simulación *in vitro* del tracto intestinal.

5. METODOLOGÍA

5.1 Microorganismos

Se utilizaron cepas de *Lactobacillus casei* Shirota aislada de Yakult y *Escherichia coli* (cepa silvestre). Antes de ser utilizados en cada uno de los experimentos de simulación *L. casei* Shirota se cultivó en 50 mL de leche durante 48 h a 37°C y posteriormente se transfirió a 50 mL de caldo Mann-Rogosa-Sharp (MRS) en el que se cultivó por 24 h a la misma temperatura. *E. coli* se cultivó en 50 mL de caldo nutritivo y se incubó a 37°C durante 24 horas.

5.2 Simulación del tracto intestinal

La simulación consistió en el uso botellas serológicas de 50 mL para el intestino delgado, de frascos de vidrio de 100 mL para el colon ascendente y de 250 mL para el colon transversal y el colon descendente (Figura 9) con las condiciones indicadas en la Tabla 10. Los frascos se colocaron en un agitador mecánico (Environ Shaker) para mantenerlos a una temperatura de 37°C y con una agitación de 150 rpm que de acuerdo a Molly *et al* (1993), reproduce los movimientos peristálticos.

El medio utilizado en la simulación se preparó tomando como base el medio descrito por Molly *et al* (1993). El medio contenía en (g/L): fuente de carbono, 1.0; extracto de levadura, 3; proteosa-peptona, 1; NaHCO₃, 0.4; NaCl, 0.08; K₂HPO₄, 0.04; KH₂PO₄, 0.04; CaCl₂, 0.008; MgSO₄•7H₂O, 0.008; sales biliares, 0.04; Tween 80, 1 mL/L. El pH se ajustó al correspondiente para cada región con soluciones de HCl o NaOH, ambas 0.1 N.

Se realizaron tres experimentos, cada uno por triplicado: El experimento control, en el cual la fuente de carbono era glucosa, y dos experimentos de prueba; para el primero de estos, la fuente de carbono era Oligomate 55, para el segundo, se realizó la simulación con un medio que además del Oligomate 55 como fuente de carbono contenía de acuerdo a Shin *et al*. (1998), lactoferrina (3 g/L). En todos los casos, sólo se inoculó el primer

frasco (intestino delgado) con 0.4 mL de *L. casei* Shirota y 2.1 mL de *E. coli* para obtener concentraciones similares, siendo los valores para cada uno de los microorganismos de 7.457 y 7.600 log₁₀ (ufc/mL) para *E. coli* y *L. casei* Shirota respectivamente. Al finalizar el tiempo de simulación para el intestino delgado, el contenido de este frasco se transfirió manualmente al siguiente para iniciar la simulación del colon ascendente y así sucesivamente para simular el colon transverso y el colon descendente.

Tabla 10. Condiciones de simulación (Modificadas de Molly *et al.*, 1993 y Macfarlane *et al.*, 1998).

Región simulada	Condiciones	Tiempo de residencia (h)	Volumen de líquido (mL)
Intestino delgado	pH 7.2	4	30
Colon ascendente	pH 5.5	8	70
Colon transverso	pH 6.2	12	130
Colon descendente	pH 6.8	9	170



Figura 9. Simulación del tracto intestinal

5.3 Cuantificación del crecimiento microbiano

Las muestras se tomaron en intervalos de 1 h para el intestino delgado, de 2 h para el colon ascendente y de 3 h para el colon transverso y el colon descendente para determinar el número de organismos viables en el tiempo determinado para cada región del tracto intestinal simulada. Se prepararon diluciones seriales (10^2 - 10^{10}) de cada muestra utilizando agua peptonada (peptona de caseína al 1.0%) con un pH de 7.2. Para

determinar el número de ufc/mL se utilizó la técnica de siembra en placa de Miles y Misra (Weng *et al.*, 2004) sembrando por duplicado cajas Petri con agar MRS para *L. casei* Shirota (Figura 10) y agar Eosina Azul de Metileno (EMB) para *E. coli* (Figura 11).

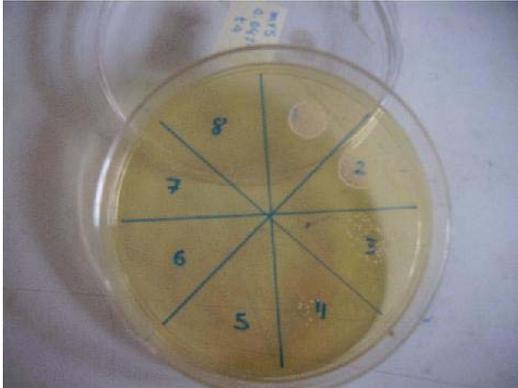


Figura 10. Siembra en placa de *L. casei* Shirota

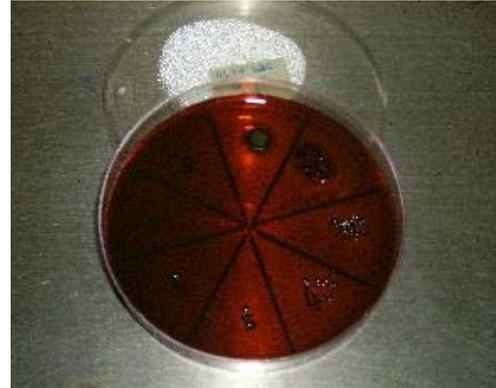


Figura 11. Siembra en placa de *E. coli*

5.4 Determinación de pH en las regiones simuladas

Se tomaron muestras de 5 mL del medio que contenían los fermentadores únicamente para los tiempos inicial y final de cada una de las regiones simuladas y para cada una de las fuentes de carbono utilizadas (glucosa, Oligomate 55 y Oligomatte 55 + lactoferrina). Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm (20000 x g) por 10 minutos a una temperatura de 4 °C de acuerdo a lo reportado por Fooks y Gibson (2002) para eliminar los microorganismos presentes y así determinar el pH.

5.5 Pruebas de inhibición (pH y bacteriocinas)

Para determinar la presencia de bacteriocinas se utilizó el mismo sobrenadante de las muestras obtenidas para la determinación de pH. Se realizaron dos pruebas (por duplicado); en la primera prueba para la medición de los halos, se utilizaron muestras sin ajustar el pH (para conocer el efecto de la acidez del medio), y en la segunda las muestras se neutralizaron en cada uno de los casos hasta un pH final de 7 utilizando una solución de NaOH 1M. Posteriormente fueron esterilizadas por filtración haciéndolas

pasar a través de una membrana estéril de 0.22 μm (Fooks y Gibson, 2002), y fueron probadas utilizando la técnica de difusión en pozos modificada de Schillinger y Lücke (1989). Las placas (cajas Petri de 10 cm de diámetro) se prepararon utilizando agar EMB como soporte para un tapete de células de *Escherichia coli* (se realizó un cultivo previo de este microorganismo de prueba en caldo nutritivo por 24 horas) del cual se inocularon 0.5 mL (1×10^8 ufc/mL) por la técnica de vaciado en placa en cada una de las cajas, en las que posteriormente se realizaron los pozos de 6 mm de diámetro y se llenaron con 30 μL de cada una de las muestras. Se realizó también un control en el cual los pozos contenían medio de cultivo preparado de la misma manera que el utilizado en las simulaciones y que únicamente había sido esterilizado, esto para conocer si existía en el medio algún compuesto que pudiera causar la inhibición de los microorganismos. Las cajas se dejaron reposar por media hora a temperatura ambiente para que el sobrenadante colocado en los pozos fuera absorbido y se incubaron a 37 °C por 24 h para después medir la extensión de la zona de inhibición (radio del halo en mm) obtenida.

5.6 Consumo de la fuente de carbono

Se tomó 1 mL de muestra en los mismos intervalos utilizados en la cuantificación del crecimiento microbiano para las simulaciones que contenían glucosa y Oligomate 55. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm (20000 x g), a 4 °C por 10 minutos. Del sobrenadante obtenido se realizaron diluciones 1/100 y posteriormente se determinó la cantidad de azúcares presentes mediante la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956): a 1 mL de muestra se le agrega 1 mL de una solución de fenol al 5% y posteriormente se agregan lentamente 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Después de la reacción, la concentración de azúcares totales se obtuvo mediante espectrofotometría a una absorbancia de 490 nm y utilizando la ecuación obtenida con la curva patrón de glucosa realizada de 0-100 $\mu\text{g/mL}$.

5.7 Análisis de consumo de Oligomate 55 por HPLC

Los sobrenadantes de las muestras obtenidas de la fermentación con Oligomate 55 como fuente de carbono (sólo los tiempos iniciales y finales de cada una de las regiones) fueron filtrados a través de una membrana de 22 μm para eliminar los contaminantes y ser analizadas por HPLC (se utilizó una columna RSO-oligosacáridos de 7.8 x 150 mm (Phenomenex, Rezek) y un detector Light Scattering (Polymer Laboratorios), se eluyó con agua desionizada a un flujo de 0.3 mL/min. La columna se mantuvo a una temperatura de 75 °C y el detector a 110 °C). Las concentraciones de los azúcares encontrados se calcularon mediante el uso de curvas patrón realizadas para cada uno de ellos.

5.8 Consumo de Oligomate 55 por *L. casei* Shirota

Se realizó una fermentación con una duración de 48 h, creciendo *L. casei* Shirota en una botella sexológica que contenía 50mL del medio de simulación utilizado anteriormente al cual se le ajustó el pH a 7.2 como si se simulara el intestino delgado y se agitó a 150 rpm. Se tomaron muestras a intervalos de 3 h para determinar el número de ufc/mL mediante cuenta en placa y cuantificar la cantidad de azúcares presentes con la técnica de fenol-sulfúrico.

5.9 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos para el crecimiento de los dos microorganismos estudiados se analizaron graficando el número de ufc/mL de cada uno contra el tiempo de simulación para observar su comportamiento. Con los datos numéricos obtenidos de cada simulación se realizó un análisis estadístico (ANOVA, $\alpha= 0.05$) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados usando como variable de respuesta el número de ufc/mL.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cuantificación del crecimiento durante la simulación del tracto intestinal

Se llevó a cabo la simulación del intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente en fermentaciones con una duración de 33 h utilizando distintas fuentes de carbono. De acuerdo a la Tabla 11, para el medio que contenía glucosa como fuente de carbono que en este caso fue el medio control, se observó que las poblaciones iniciales fueron de $7.457 \log_{10}$ (ufc/mL) y 7.600 para *E. coli* y *L. casei* Shirota respectivamente y las finales de $9.424 \log_{10}$ (ufc/mL) para *E. coli* y de 11.334 para *L. casei* Shirota. En la Figura 12 se muestra el crecimiento de los microorganismos durante la simulación del tracto intestinal y se observa que entre ambas poblaciones, empieza a notarse una diferencia en cuanto al número en su población [en \log_{10} (ufc/mL)] después de transcurridas 12 h, tiempo que corresponde al colon transversal, siendo *L. casei* Shirota el microorganismo con mayor crecimiento; tomando en cuenta que este medio fue utilizado como control, no se esperaba encontrar una diferencia significativa entre las dos poblaciones ya que de acuerdo a lo reportado por Sako *et al.* (1999), tanto las cepas de *E. coli* como las de *L. casei* son capaces de crecer utilizando la glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, el análisis estadístico, muestra que si existen diferencias significativas entre las poblaciones de ambos microorganismos para las regiones del intestino delgado, colon transversal y colon descendente. Estas diferencias, que en el caso del colon transversal y colon descendente, como ya se mencionó, representan un mayor crecimiento de *L. casei* Shirota podrían deberse principalmente a algunos de sus mecanismos de acción para la supresión de bacterias patógenas (Figura 4), como la disminución en los valores de pH debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta, las bacteriocinas o los productos que son tóxicos para los microorganismos patógenos como el peróxido de hidrógeno entre otros (Tabla 7). Aún sin la presencia de productos prebióticos que estimulen el crecimiento de las bacterias probióticas, su presencia puede disminuir o mantener bajos y constantes los niveles de las bacterias patógenas, y que fue lo que ocurrió en este trabajo con *E. coli*.

Tabla 11. Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el medio con glucosa.

log(ufc/mL)			log(ufc/mL)		
Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>L. casei</i>	Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>L. casei</i>
<i>INTESTINO DELGADO</i>			<i>COLON ASCENDENTE</i>		
0	7.457	7.600	0	7.985	8.430
1	7.648	7.314	2	8.762	8.667
2	8.466	7.617	4	8.493	8.934
3	9.325	8.803	6	8.458	8.953
4	8.528	8.520	8	8.451	8.854
<i>COLON TRANSVERSO</i>			<i>COLON DESCENDENTE</i>		
0	8.042	8.008	0	8.699	10.049
3	8.788	9.544	3	9.247	10.839
6	9.224	9.816	6	9.204	10.399
9	9.638	10.145	9	9.424	11.334
12	9.457	11.122			

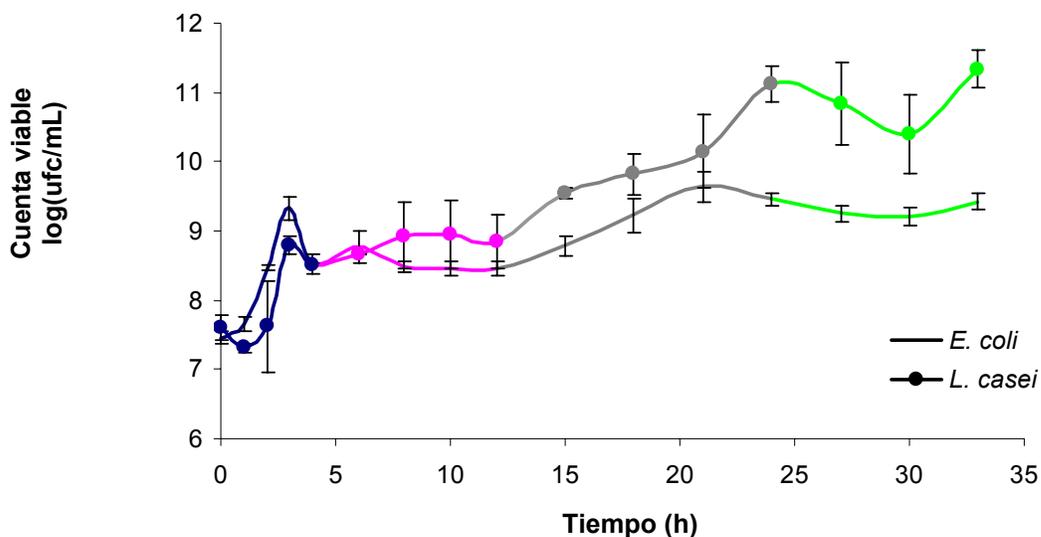


Figura 12. Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el medio con glucosa. Intestino delgado, colon ascendente, colon transverso, colon descendente.

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos en la simulación empleando Oligomate 55 como fuente carbono para el medio de prueba; en este caso, las poblaciones obtenidas de acuerdo a la Tabla 12, fueron: al inicio 7.557 log₁₀ (ufc/mL) y al final 10.264 para *E. coli*, y de 7.599 log₁₀ (ufc/mL) al inicio y 12.143 al final para *L. casei* Shirota. A diferencia de los resultados para la simulación con el medio que contenía glucosa, se observa que la diferencia entre ambos microorganismos se presentó a partir de las 18 h de iniciada la simulación, tiempo que corresponde al final de la región del colon transverso. El análisis estadístico muestra que existieron diferencias entre ambas poblaciones sólo para la región del colon descendente mientras que para la simulación que utilizó glucosa como fuente de carbono existieron diferencias para tres de las cuatro regiones simuladas. Dado que en esta simulación se utilizó el Oligomate 55 como prebiótico, se esperaba que por su efecto estimulante, el crecimiento de *L. casei* Shirota fuera mayor en comparación con el medio control, y por consiguiente, haría disminuir eficazmente a la población de *E. coli* mediante algunos de los mecanismos mostrados en la Figura 4, sin embargo, esto no ocurrió. Los resultados obtenidos en esta simulación concuerdan con lo reportado por Rycroft *et al* (2001). Ellos observaron que los GOS estimulaban principalmente el crecimiento de bifidobacterias y no de lactobacilos.

Tabla 12. Crecimiento de *E.coli* y *L. casei* Shirota en el medio con Oligomate 55

log(ufc/mL)			log(ufc/mL)		
Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>L. casei</i>	Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>L. casei</i>
<i>INTESTINO DELGADO</i>			<i>COLON ASCENDENTE</i>		
0	7.557	7.599	0	8.398	8.512
1	7.875	8.407	2	9.247	9.457
2	8.960	8.265	4	9.506	9.648
3	9.388	9.234	6	9.470	9.537
4	9.787	9.569	8	9.977	10.237
<i>COLON TRANSVERSO</i>			<i>COLON DESCENDENTE</i>		
0	8.082	8.616	0	8.525	10.214
3	9.521	10.031	3	9.559	10.954
6	9.430	10.326	6	10.264	11.555
9	9.682	10.352	9	10.264	12.143
12	9.944	10.864			

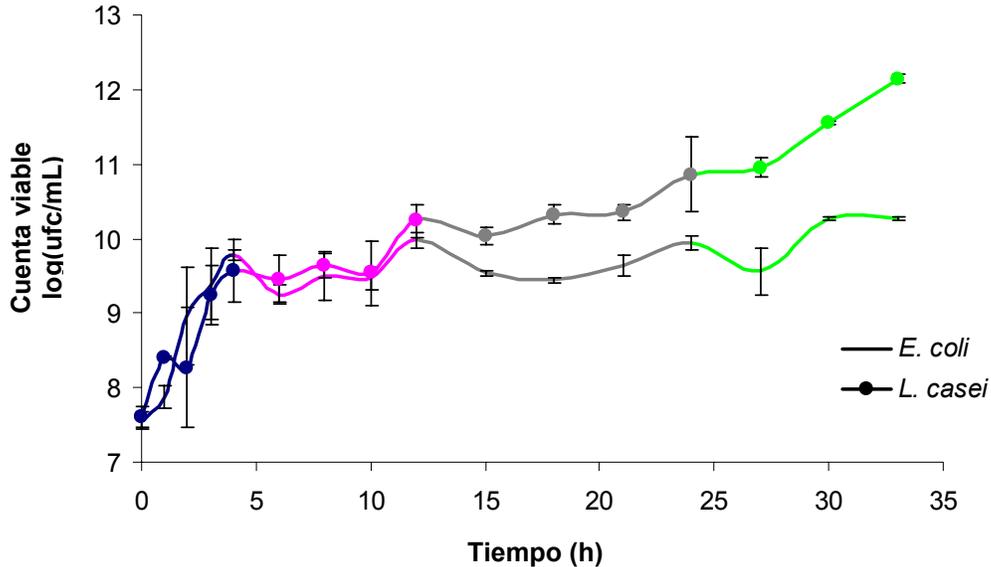


Figura 13. Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el medio con Oligomate 55. Intestino delgado, colon ascendente, colon transverso, colon descendente.

La Figura 14 muestra los datos para las curvas de crecimiento de los dos microorganismos estudiados cuando se utilizó para el medio de prueba Oligomate 55 como fuente de carbono y adicionando lactoferrina, buscando estimular de mejor forma el crecimiento de *L. casei* Shirota mediante el uso del compuesto prebiótico (Oligomate 55), y la adición de una proteína con acción prebiótica y antimicrobiana (Fox y Flynn, 1992), sin embargo, como se muestra en la Tabla 13 y se observa claramente en la figura ya mencionada, las poblaciones de ambos microorganismos no muestran diferencias significativas entre sus cuentas viables, siendo las poblaciones iniciales de 7.900 y 7.799 \log_{10} (ufc/mL) y finales de 9.482 y 9.398 \log_{10} (ufc/mL) para *E. coli* y *L. casei* Shirota respectivamente. Esto puede sugerir que a diferencia de lo reportado por Shin *et al.* (1998) quienes encontraron que 3 g/L de lactoferrina fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *E. coli*. En este experimento se utilizó la misma concentración de ésta sustancia, pero no fue suficiente para inhibir el crecimiento de la bacteria patógena. Además, se debe resaltar el hecho de que en esta simulación no sólo, no se obtuvo el efecto estimulante con el Oligomate 55, sino que además se observó una disminución en las cuentas viables de *L. casei* Shirota con respecto a la simulación sólo con Oligomate 55.

Tabla 13. Crecimiento de *E.coli* y *L. casei* Shirota en el medio con Oligomate 55+lactoferrina

log(ufc/mL)			log(ufc/mL)		
Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>L. casei</i>	Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>L. casei</i>
<i>INTESTINO DELGADO</i>			<i>COLON ASCENDENTE</i>		
0	7.900	7.799	0	8.125	8.289
1	7.574	8.356	2	9.228	9.298
2	8.182	7.645	4	9.823	9.845
3	9.013	8.953	6	8.347	8.383
4	9.097	8.763	8	8.358	9.966
<i>COLON TRANSVERSO</i>			<i>COLON DESCENDENTE</i>		
0	7.657	8.812	0	8.410	8.574
3	9.398	9.097	3	8.811	9.097
6	9.398	9.463	6	9.574	9.398
9	9.273	9.127	9	9.482	9.398
12	9.130	9.214			

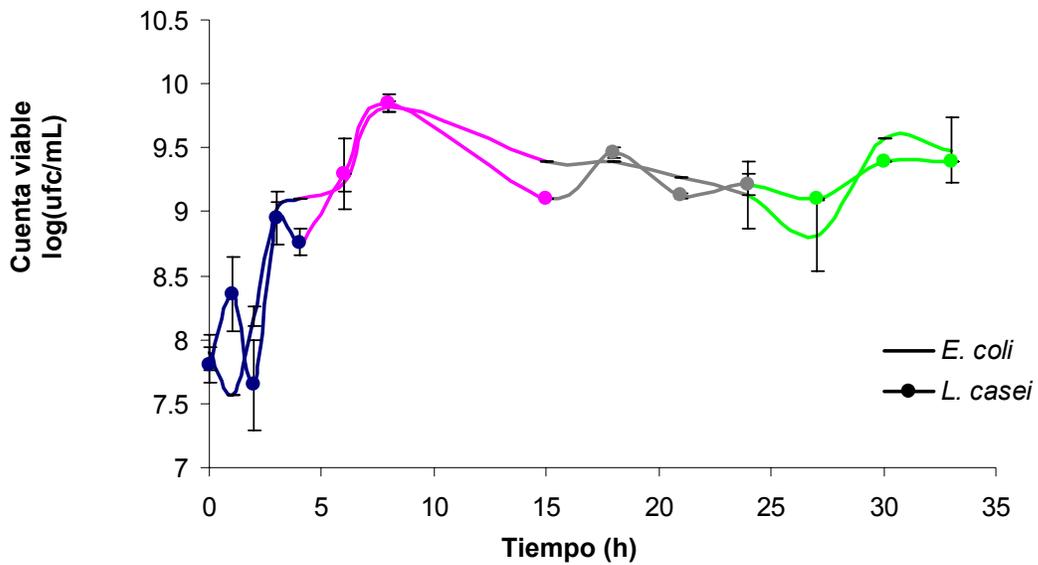


Figura 14. Crecimiento de *E. coli* y *L. casei* Shirota en el medio con Oligomate 55 + lactoferrina. Intestino delgado, colon ascendente, colon transverso, colon descendente.

Una vez que se comparó el crecimiento de los dos microorganismos, se determinó que sí existieron diferencias significativas entre ambos para las regiones del colon transversal y el colon descendente, se decidió analizar el crecimiento de los microorganismos por separado para el inicio y el final de cada región para determinar si existía diferencia entre las distintas fuentes de carbono utilizadas. De acuerdo al análisis estadístico realizado para el crecimiento de *E. coli* (Figura 15) y *L. casei* Shirota (Figura 16), se determinó que sí existió diferencia significativa entre el crecimiento de *E. coli* en un medio con glucosa y otro con Oligomate 55 para todas las regiones simuladas, presentándose un mayor crecimiento en el medio que contenía Oligomate 55 como fuente de carbono. Por otro lado, para *L. casei* Shirota únicamente existieron diferencias significativas para las regiones del colon ascendente y el colon descendente, siendo mayor el crecimiento para el medio con Oligomate 55.

Con los resultados obtenidos en el análisis estadístico del crecimiento de *L. casei* Shirota se puede suponer que ésta cepa no está consumiendo los compuestos prebióticos contenidos en el Oligomate 55 como reportaron Sako *et al.* (1999), quienes determinaron que las cepas de *L. casei* utilizadas en sus experimentos, no fueron capaces de consumir la 4'-galactosil-lactosa que es el principal componente de los GOS contenidos en el Oligomate 55. Estos mismos autores reportaron que la cepa de *E. coli* no fue capaz de consumir la 4'-galactosil-lactosa por lo que en la simulación realizada durante este estudio se asumió de inicio que la bacteria patógena no la consumía. En este caso puede pensarse entonces, que bajo las condiciones utilizadas en la simulación, la cepa de *Lactobacillus casei* variedad Shirota probablemente, tampoco fue capaz de consumir este compuesto. Sin embargo, el hecho de que el crecimiento de *E. coli* se vea incrementado con respecto al medio control, hace pensar que es posible que en su composición, el Oligomate 55 contenga azúcares que pueden fomentar el crecimiento de la bacteria patógena. Y que sean estos mismos, los que estén siendo consumidos por *L. casei* Shirota. Debido a lo anterior, se decidió estudiar más a fondo el consumo de todos los azúcares contenidos en el Oligomate 55 con la finalidad de conocer cuáles de ellos estaban siendo consumidos durante la simulación.

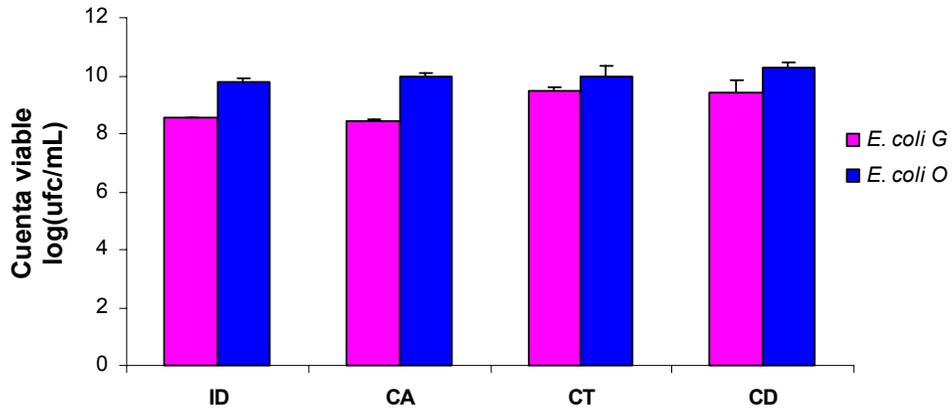


Figura 15. Comparación del crecimiento de *E. coli* en glucosa y Oligomate 55 en las regiones simuladas. ID: intestino delgado; CA: colon ascendente, CT: colon transverso; CD: colon descendente. G: glucosa; O: Oligomate 55.

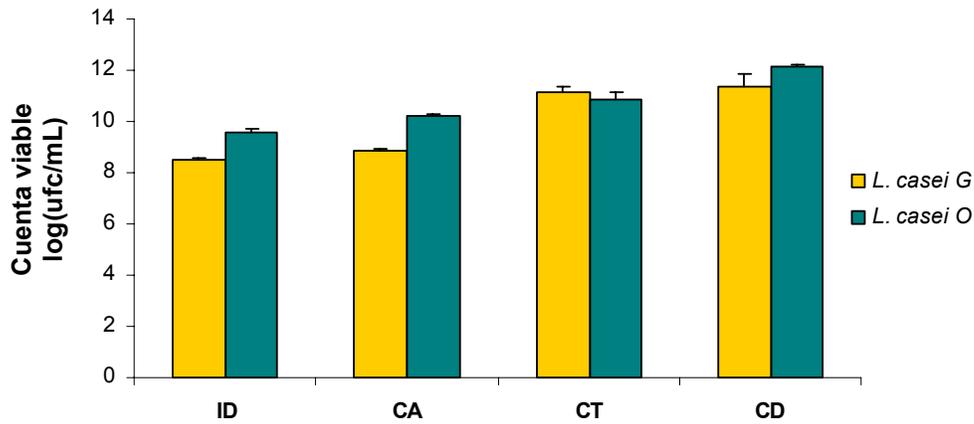


Figura 16. Comparación del crecimiento de *L. casei* Shirota en glucosa y Oligomate 55 en las regiones simuladas. ID: intestino delgado; CA: colon ascendente, CT: colon transverso; CD: colon descendente. G: glucosa; O: Oligomate 55.

6.2 Consumo de la fuente de carbono

Como los resultados obtenidos en cada una de las cinéticas de prueba mostraron que el Oligomate 55 no está ejerciendo un efecto de estimulación sobre el crecimiento de *L. casei* Shirota, se pensó que tal vez los azúcares prebióticos contenidos en el producto no estaban siendo consumidos por ésta bacteria y debido a esto, no se estaba presentando el efecto de estimulación. De esta forma, se realizaron nuevamente simulaciones en las que se cuantificó el consumo de glucosa (Figura 17) y de Oligomate 55 (Figura 18) mediante la técnica de fenol-sulfúrico. En las figuras mencionadas, se observa que en el intervalo que hay entre el final de una región y el inicio de la siguiente, se presenta un aumento (★) en la concentración de la fuente de carbono; esto se debe a que el contenido de cada región que ya había sido simulada se transfería a un nuevo frasco, el cual contenía medio fresco con una nueva concentración del azúcar correspondiente.

La Tabla 14 muestra el consumo de azúcar al final de cada región simulada. En el caso de la glucosa, el consumo llegó hasta 84% del valor inicial, mientras que con Oligomate 55, el mayor consumo fue alrededor del 55%. Esto indica que los azúcares contenidos en el Oligomate 55, fueron consumidos en menor porcentaje, sin embargo, recordando la comparación de los datos sobre crecimiento en términos de $\log_{10}(\text{ufc/mL})$, el crecimiento en ambas fuentes de carbono fue muy similar y cuando existieron diferencias significativas se debió a que el crecimiento fue mayor en Oligomate 55 para ambos microorganismos.

De esta forma, se decidió realizar un análisis mediante HPLC para determinar la identidad y la cantidad de los azúcares consumidos durante la simulación con Oligomate 55 ya que probablemente sólo algunos de los azúcares contenidos en el producto fueron consumidos tanto por *E. coli* como por *L. casei* Shirota y ambos lograron incrementar su número con respecto al medio control que contenía glucosa

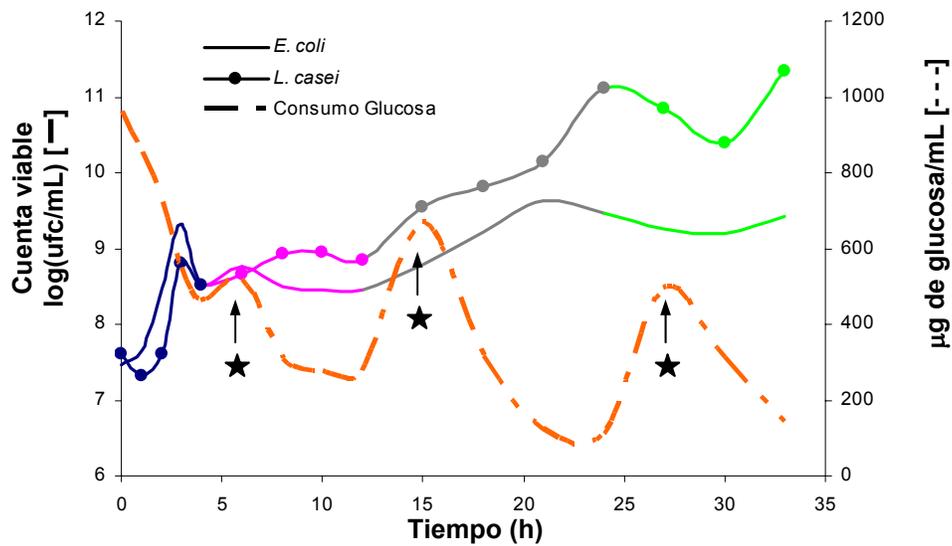


Figura 17. Consumo de glucosa y crecimiento de *L. casei* Shirota y *E. coli*. Intestino delgado, *colon ascendente*, *colon transverso*, *colon descendente*.

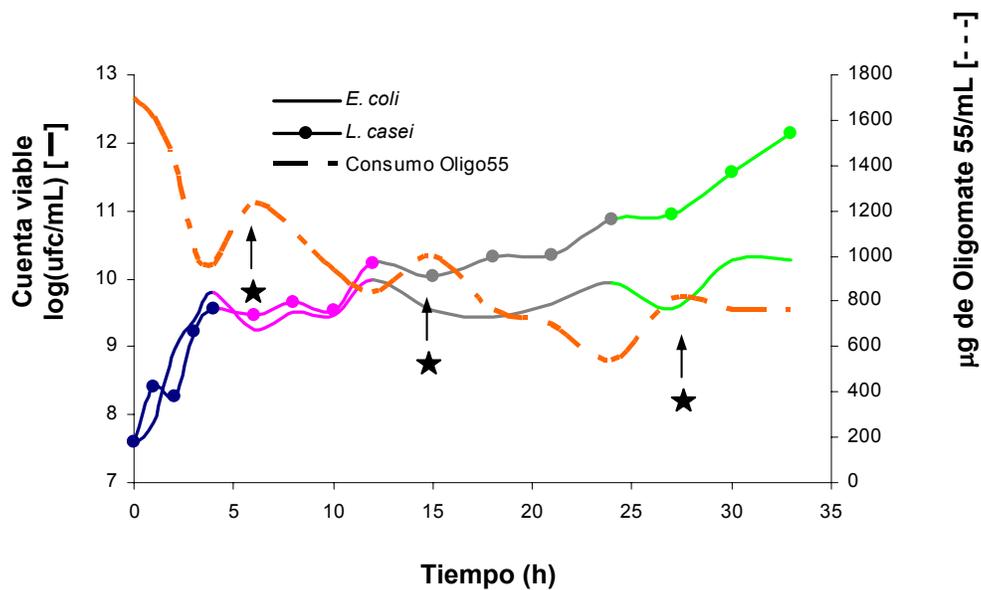


Figura 18. Consumo de Oligomate 55 y crecimiento de *L. casei* Shirota y *E. coli*. Intestino delgado, *colon ascendente*, *colon transverso*, *colon descendente*.

Tabla 14. Consumo de azúcares: glucosa (control); Oligomate 55 (prebiótico).

Región	Glucosa (µg/mL)	Oligomate 55 (µg/mL)	Tiempo de Simulación	% consumido de azúcar	
				Glucosa	Oligomate 55
ID	961.3	1700.6	4	52.02	43.47
CA	519.9	1233.1	8	58.61	43.25
CT	667.8	993.9	12	83.82	55.05
CD	493.8	812.7	10	74.44	40.36

Las Figuras 19 y 20 muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC, en donde se observan los azúcares contenidos en el Oligomate 55 que se consumieron durante la simulación. Los picos que aparecen antes de los 15 minutos pertenecen a los GOS contenidos en el producto y los tres picos de los azúcares que aparecen después de los 15 minutos eran: lactosa, glucosa y galactosa respectivamente. De acuerdo a los cromatogramas se puede deducir que ninguno de los microorganismos estudiados consumió el prebiótico (GOS) ya que su concentración permanece constante a lo largo de la fermentación de 33 horas, caso contrario a lo que ocurrió con el resto de los azúcares.

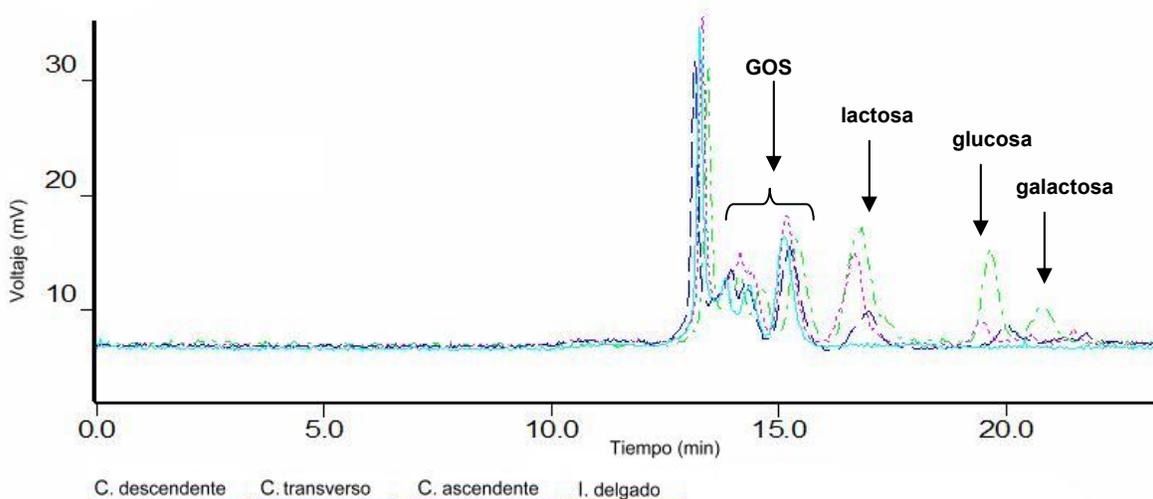


Figura 19. Consumo de Oligomate 55 en las regiones simuladas al tiempo inicial.

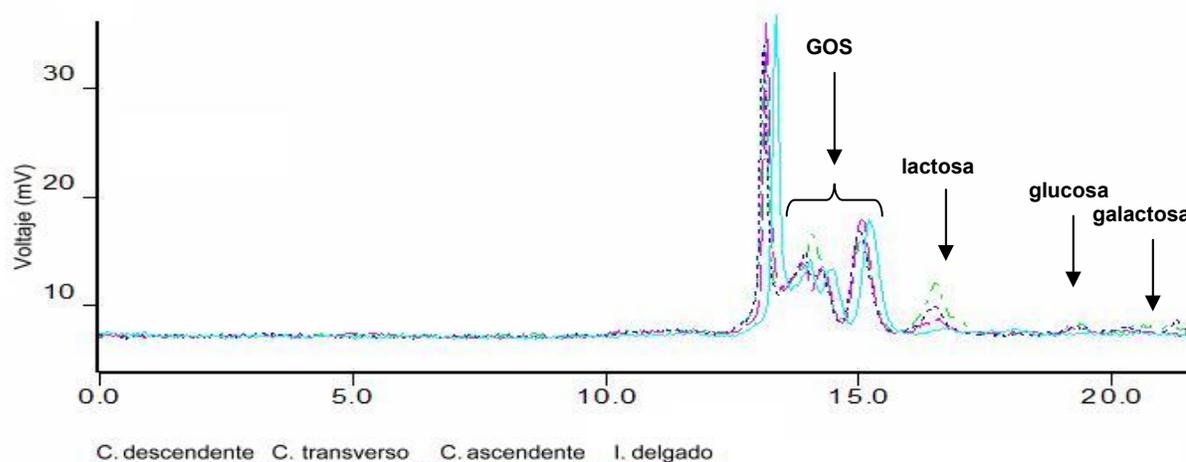


Figura 20. Consumo de Oligomate 55 en las regiones simuladas al tiempo final.

Tabla 15. Concentración de azúcares en las distintas regiones simuladas, T: tiempo.

CONCENTRACIÓN DE AZUCARES ($\mu\text{g/mL}$)								
	GALACTOSIDOS		LACTOSA		GLUCOSA		GALACTOSA	
Región	T. inicial	T. final	T. inicial	T. final	T. inicial	T. final	T. inicial	T. final
ID	361.46	349.17	450.83	246.74	165.26	85.83	114.94	86.77
CA	474.26	423.76	338.26	190.61	96.16	80.22	80.19	79.87
CT	446.97	382.20	233.50	173.40	91.28	79.79	76.56	0.00
CD	392.69	388.21	180.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Esto se comprobó mediante el cálculo de la concentración de azúcares presentes en cada una de las regiones simuladas (Tabla 15) y se muestra claramente en la Figura 21, en donde se observa que al final de la fermentación el medio ya no contiene lactosa, glucosa y galactosa. Así mismo, se observa que la cantidad de GOS no disminuyó sensiblemente, manteniéndose alrededor de los 400 mg/mL. De ahí que la población de *L. casei* Shirota no mostrara (Figura 21). Por lo tanto, fue con el consumo del resto de los azúcares: lactosa, glucosa y galactosa (Figuras 22, 23 y 24) que se mantuvo el crecimiento. Tanto los resultados mostrados en los cromatogramas (Figuras 19 y 20) como los datos de la Tabla 15, confirman que el azúcar prebiótico contenido en el Oligomate 55 o estaba siendo consumido por ninguna de las dos cepas utilizadas en las simulaciones. Esto concuerda con lo reportado por Sako *et al.* (1999).

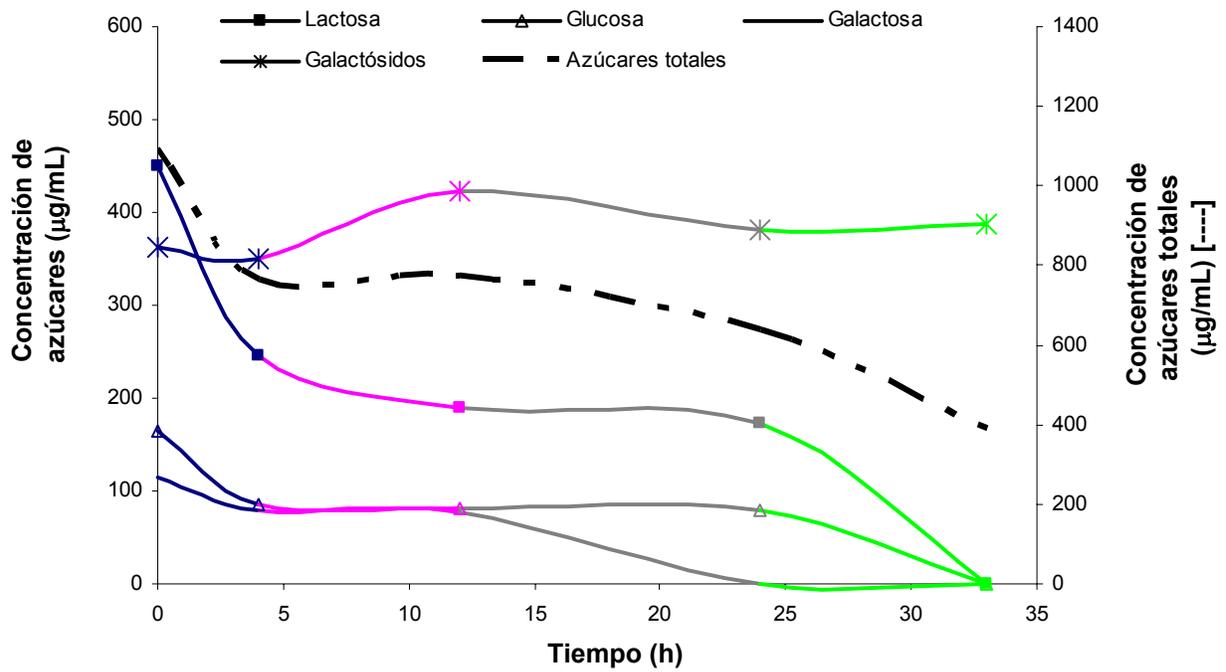


Figura 21. Consumo de los azúcares contenidos en el Oligomate 55 por *L. casei* Shirota y *E. coli*. Intestino delgado, colon ascendente, colon transverso, colon descendente.

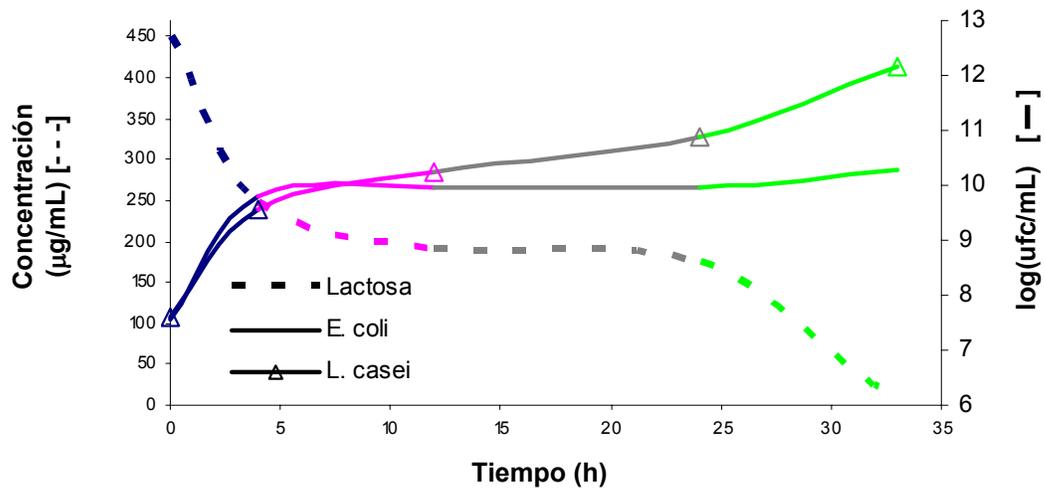


Figura 22. Consumo de lactosa y crecimiento de *L. casei* Shirota y *E. coli* en las regiones simuladas. Intestino delgado, colon ascendente, colon transverso, colon descendente.

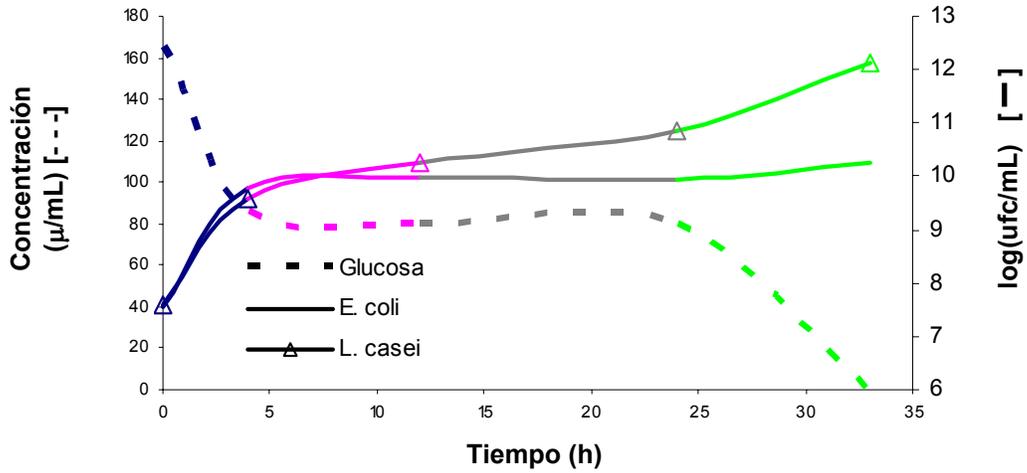


Figura 23. Consumo de glucosa y crecimiento de *L. casei* Shirota y *E. coli* en las regiones simuladas. Intestino delgado, colon ascendente, colon transversa, colon descendente.

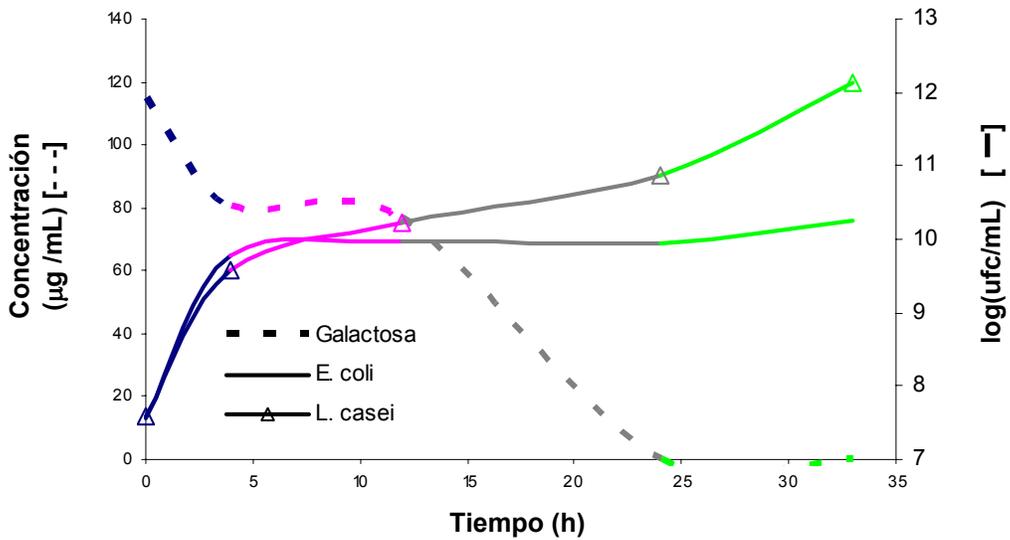


Figura 24. Consumo de galactosa y crecimiento de *L. casei* Shirota y *E. coli* en las regiones simuladas. Intestino delgado, colon ascendente, colon transversa, colon descendente.

6.3 Consumo de Oligomate 55 por *Lactobacillus casei* Shirota

Debido a que los resultados obtenidos mediante HPLC muestran que durante el tiempo de simulación, el compuesto prebiótico (4'-galactosil-lactosa) contenido en el Oligomate 55 no fue consumido por alguno de los dos microorganismos estudiados (Figura 21), se decidió realizar una fermentación en la que únicamente se utilizó *L. casei* Shirota para determinar si este microorganismo era capaz de consumir el compuesto prebiótico cuando crecía en un cultivo axénico. La Figura 25 muestra el crecimiento del microorganismo y el consumo del Oligomate 55 durante la fermentación. Se observa que los cambios acelerados de consumo de sustrato y de cuentas viables ocurrieron durante las primeras 12 h, mientras que después de este tiempo, la concentración de Oligomate 55 en el medio se mantuvo constante y el número de ufc/mL fue disminuyendo drásticamente hasta las 21 h, después de este tiempo permaneció constante hasta el final del experimento. La Tabla 16 muestra el porcentaje de azúcar consumido durante este experimento y, se observa que, hasta las 48 h se había consumido el 35% del azúcar, sin embargo, debe tomarse en cuenta que después de las 12 h fue imposible para *L. casei* Shirota mantener su población por lo que era de esperarse un consumo más lento del azúcar contenido en el medio.

Es claro que el consumo de azúcares por parte de los dos microorganismos es mayor que el consumo de *L. casei* Shirota ya que al comparar la Tabla 14 con la Tabla 16, se observó que a las 33 h, el consumo de azúcar fue mayor (40.36%) para la fermentación con ambos microorganismos que para el cultivo axénico en el que el consumo fue de 30.43%. Sin embargo, en la Figura 21 se mostró claramente que no hubo consumo del azúcar prebiótico y se podría suponer que el crecimiento que tuvo la bacteria probiótica, en este caso, fue a base del consumo de los azúcares no prebióticos, en especial de la glucosa y la galactosa que representan alrededor del 30% de los azúcares totales y que, de acuerdo a Sako *et al* (1999), son mejor sustrato que la lactosa. Por otra parte, de acuerdo al análisis de HPLC, estos dos azúcares representan alrededor del 30% de los azúcares totales lo que nos lleva a concluir que no existió un consumo selectivo de los GOS contenidos en el Oligomate 55 por parte de *L. casei* Shirota.

Tabla 16. Consumo de Oligomate 55 por *L. casei* Shirota.

Tiempo (h)	% Azúcar consumido
0	0
12	24.65
21	29.80
27	29.05
33	30.43
42	32.45
48	35.21

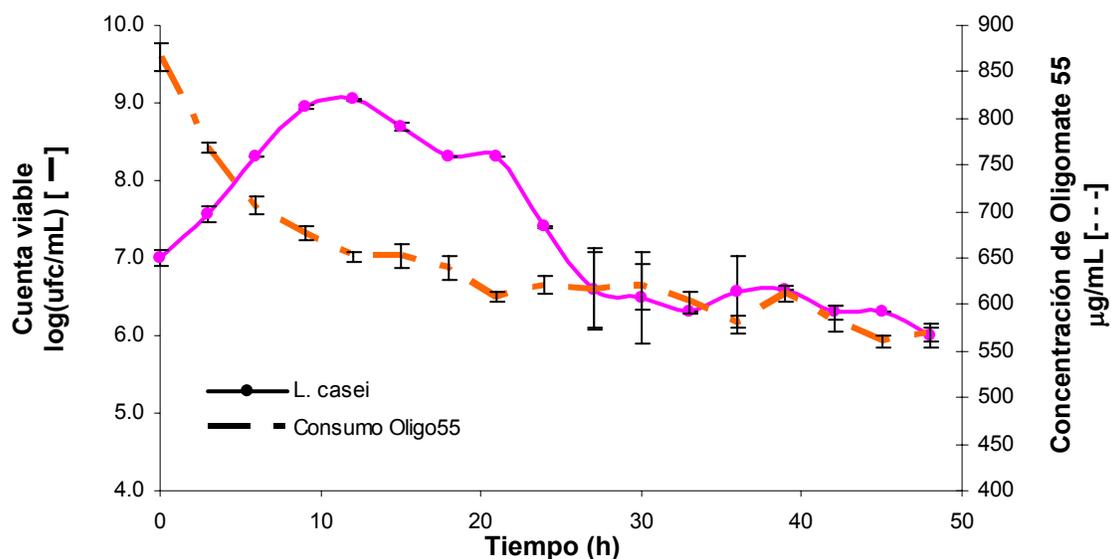


Figura 25. Consumo de Oligomate 55 por *L. casei* Shirota.

6.4 Pruebas de inhibición (pH y bacteriocinas)

Aún cuando no se obtuvo una disminución en el crecimiento de la bacteria patógena mediante el uso del compuesto prebiótico con respecto al medio control, se decidió analizar dos de los factores reportados en la Tabla 4 que pudieran haber mantenido el crecimiento de *E. coli* por debajo del crecimiento de *L. casei* Shirota. De esta forma, se

analizó el efecto de la acidez (en función del pH) y la producción de sustancias inhibitoras del crecimiento (bacteriocinas) en el crecimiento de la bacteria patógena. La Tabla 17 muestra los valores de pH obtenidos al inicio y al final de cada una de las regiones simuladas. De acuerdo a los resultados, la mayor acidificación del medio se obtuvieron utilizando como fuente de carbono la glucosa, ya que se iniciaron con un pH de 7.2 y se finalizó con un pH de 4.93, mientras que para Oligomate 55 y Oligomate 55 con lactoferrina iniciaron con valores de 7, se obtuvieron valores finales de 6.23 y 6.30 respectivamente. Estos resultados podrían explicar que en las simulaciones con Oligomate 55, las cuentas viables de *E. coli* fueran mayores en el medio con Oligomate 55 y no en las simulaciones con glucosa que tuvieron un pH final cercano a 4, debido al efecto que la acidez del medio puede tener sobre el crecimiento de esta bacteria (Ogawa *et al.*, 2001, Fooks y Gibson, 2002, Maragkoudakis *et al.*, 2005 y Zalán *et al.*, 2005).

Tabla 17. Cambios en el pH durante la simulación del tracto intestinal.

Región	Glucosa		Oligomate 55		Olig 55+LacF	
	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final	pH inicial	pH final
ID	7.22	5.07	7.06	5.51	7.013	5.633
CA	5.23	4.99	5.54	5.53	5.947	5.683
CT	5.84	4.71	5.60	5.92	6.267	5.807
CD	5.00	4.93	6.10	6.23	6.617	6.300

De acuerdo a los datos de las pruebas de inhibición que se presentan en la Tabla 18, se observó que existió un efecto de la disminución del pH del medio sobre el crecimiento de *E. coli* ya que los halos de inhibición en los casos sin control de pH fueron mayores que los obtenidos cuando se neutralizó hasta un pH 7. Estos resultados coinciden con lo reportado por Fooks y Gibson (2002), quienes observaron que cuando los sobrenadantes utilizados en las pruebas se ajustaban a pH 7, los radios de los halos de inhibición disminuyeron. Haciendo una comparación de los resultados en las Tablas 17 y 18, se observa que los valores de pH y el tamaño de los halos de inhibición coinciden en que a valores más bajos de pH mayor radio del halo. En la Tabla 18, se observa que, además del efecto del pH, también hubo inhibición sobre el crecimiento de *E. coli* aunque en

menor grado cuando el pH se ajustó a 7. Esto podría deberse a la presencia de compuestos inhibidores del crecimiento, como son las bacteriocinas, el H₂O₂, los ácidos grasos de cadena corta, etc. (Kaur *et al.*, 2002). Es importante mencionar, que aunque esta prueba fue realizada para determinar la presencia de bacteriocinas, en otros experimentos se ha reportado que *L. casei* Shirota no ha producido este tipo de sustancias (Holzapfel *et al.*, 2001). Por otra parte, no se estudió la naturaleza de los inhibidores presentes, por lo que podría pensarse que las bacteriocinas no fueron las responsables de la inhibición o bien que fueron producidas por la bacteria patógena *E. coli* como han reportado otros trabajos (Riley y Wertz, 2002).

Tabla 18. Diámetros de los halos de inhibición (T: tiempo; SA: sin ajuste de pH)

Región	Glucosa (radio en mm)				Oligomate 55 (radio en mm)			
	SA	SA	pH 7	pH 7	SA	SA	pH 7	pH 7
	T. inicial	T. final	T. inicial	T. final	T. inicial	T. final	T. inicial	T. final
ID	0.0	3.0	0	3.0	1	4	1	4
CA	3.0	5.0	1	2.5	2	4	2	4
CT	4.5	4.5	2	3.5	5	4.5	3.5	4.5
CD	3.5	4.0	3	4.5	4	5	3	3.5

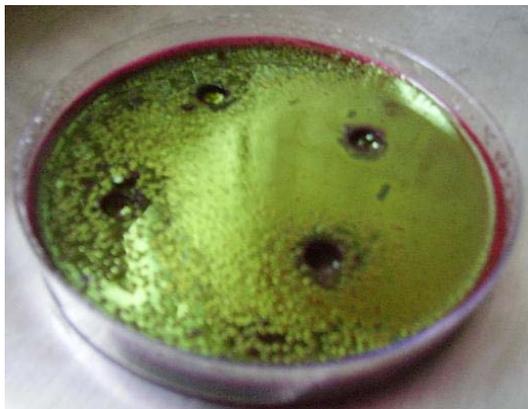


Figura 17. Siembra en placa para inhibición de *E. coli* (Caja control).

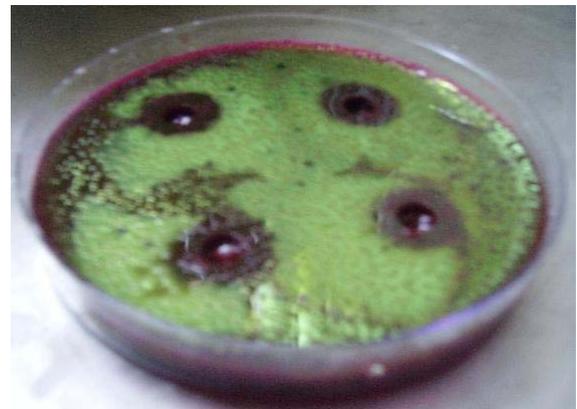


Figura 18. Siembra en placa para inhibición de *E. coli* (Caja de prueba).

7. CONCLUSIONES

- El crecimiento de *L. casei* Shirota fue mayor que el de *E. coli* en los medios que contienen glucosa y Oligomate 55. Sin embargo, el Oligomate 55 no estimuló el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota con respecto a su crecimiento en un medio con glucosa

- A diferencia del resultado que se obtuvo con el Oligomate 55, en donde el crecimiento de *L. casei* Shirota estableció diferencia con respecto al de *E. coli*, el efecto conjunto de Oligomate 55 y lactoferrina, no estimuló el crecimiento del microorganismo probiótico. Así, la lactoferrina parece tener un efecto negativo sobre ambos microorganismos, ya que es en este medio en el que se obtuvieron los valores de crecimiento más bajos.

- Aunque en el medio que contiene Oligomate 55 como fuente de carbono, el crecimiento de ambos microorganismos fue significativamente mayor para algunos tiempos, no se puede hablar de un efecto de estimulación de los compuestos prebióticos contenidos en el Oligomate 55 ya que el análisis de HPLC mostró claramente que el crecimiento estuvo soportado por el resto de los azúcares (glucosa, lactosa y galactosa), y no por los GOS contenidos en el producto. Esto indica que si el número de *E. coli* no se incrementa, se debió a la presencia de la bacteria probiótica y a los metabolitos generados por uno o ambos microorganismos, y no al efecto de estimulación selectivo que el Oligomate 55 ejercería sobre el crecimiento de *L. casei* Shirota.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Avonts, L., Van Uyten, E., y L. De Vuyst. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal*. 14: 947-955.
- Baker, N. E., Anderson, F. B., Baker, M. H., Haridas, M., Norris, E. G., Rumball, V. S. y C. A. Smith. Metal and anion binding sites in lactoferrin and related proteins. *Pure & Applied Chemistry*. 62 (6): 1067-1070.
- Blaut, M. 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*. 41 (Suppl 1): 11-16.
- Brock, J. H. 2002. The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*. 80: 1-6.
- Cagigas, A. L. y J. Blanco. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 16 (1): 63-68.
- Consignado, O. G., Peña, C. y A. V. Jalcane. 1993. In vitro study on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei* (Commercial Yakult Drink) against four diarrhea-causing organisms. *Microbial Infection and Disease*. 22 (2): 50-55.
- Crittenden R. G. y M. J. Playne. 1996. Production, properties and applications of Food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*. 7: 353-361.
- Danone Vitapole. 2002. "The World of Microbes". Número Especial. 10° Congreso Internacional de Bacteriología y Microbiología Aplicada. París.
- Delzenne, N. M. 2003. Oligosaccharides: state of art. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 177-182.

- Delzenne, N. M. y R. Roberfroid. 1994. Physiological effect of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm Wiss Technol.* 27: 1-6.
- Dubois, M., Pilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 (3): 350-356.
- Escalante, L. A. 2001. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* 21 (3): 106-114.
- Farnaud, S. y R.W. Evans. 2003. Lactoferrin –a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology.* 40: 395-405.
- Fooks, J. L., Fuller R., y G. R. Gibson. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal.* 9: 53-61.
- Fooks, J. L. y G. R. Gibson. 2002. In vitro investigations of effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology.* 39: 67-75.
- Fox, P. F. y A. Flynn. 1992. Biological properties of milk proteins. En: *Advanced Dairy Chemistry Vol. 1 Proteins.* Elsevier Applied Science, London, pp. 155-248.
- Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe K. D., Wouters, R., De Boever P., Nollet, L. y W. Verstraete. 2000. Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Applied Microbiology and Biotechnology.* 53: 219-223.
- Gomes, M. P. A. y F. X. Malcata. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties

relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology. 10: 139-157.

González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M., Z. Jiménez-Salas. 2003. Bacteriocinas de bacterias probióticas. Revista de Salud Pública y Nutrición. 4 (2): 37-52.

Gopal, K. P., Sullivan, A. P y B. J. Smart. 2000. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. International Dairy Journal. 11: 19-25.

Guyton, A. C. 1992. Tratado de Fisiología Médica. 8ª. Edición. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA. España. 1063 pp.

Holzäpfel, H. W., Haberes, P., Guisen, R., Björkroth, J y U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition. 73: 365S-373S.

Hopkins, J. M., Cumming H. J. y G. T. Macfarlane. 1998. Inter.-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. Journal of Applied Microbiology. 85: 381-386.

Kailasapathy, K. y J. Chin. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* Immunology and Cell Biology. 78: 80-88.

Kaur, I. P., Chopra, K. y A. Saini. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 15: 1-9.

- Kneifel, W., Rajal, A. y K. D. Kulbe. 2000. *In vitro* growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecology in Health Disease*. 12: 27-34.
- Lee, Y. J. y S. Salminen. 1995. The coming age of probiotic. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 241-245.
- Macfarlane, G. T., Macfarlane S. y G. R. Gibson. 1998. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigate the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microbial Ecology*. 35: 180-187.
- Maragkoudakis, A. P., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos G., Pot, B. y E. Tsakalidou. 2005. Probiotic potencial of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. 16 (3): 189-199.
- Miller, J. B., Bull, S., Miller, J. y P. McVeagh. 1994. The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variation in monosaccharide components. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 19: 371-376.
- Molly, K., Vande Woestyne, M. y W. Verstraete. 1993. Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39: 254-258.
- Nakhla, T., Fu, D., Zopf, D., Brodsky, N. y H. Hurt. 1999. Neutral oligosaccharide content of preterm human milk. *British Journal of Nutrition*. 82: 361-367.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., y Takeda, T. y Y. Takeda. 2001. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 68: 135-140.

- Ouwehand, C. A., Kirjavainen, V. P., Shortt, C. y S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 9: 42-52.
- Ouwehand, C. A., Salminen, S. y E. Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antoine van Leewenhoek*. 82: 279-289.
- Priebe, G. M., Tao He, X. S., Harmsen, M. J. H. y G.W. Welling. 2002. The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *European Journal of Nutrition*. 41 (Suppl 1):1/2-1/10.
- Riley, M. A. y J. E. Wertz. 2002. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*. 84: 357-364.
- Rosenberg, K. C. 1999. Probiotics. Natural Healing Track. New Hope Institute of Retailing. Continue Education Module. Clinical Faculty at Bastyr University.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R. y R. A. Rastall. 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 878-887.
- Sako, T., Matsumoto, K. y R. Tanaka. 1999. Recent progress on research and application of non digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 9: 69-80.
- Saloff-Coste, C. J. 1997. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud, pp. 6-10.
- Saxelin, M. 2002. LGG Summatim. 2^a. Edición Editorial Ekholmin Kirjapaino Oy, Finlandia. 61 pp.

- Schillinger, U. y F. Lücke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology. 55 (8): 1901-1906.
- Sghir, A., Chow, M. J. y R. I. Mackie. 1998. Continuous culture selection of bifidobacterias and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate. Journal of Applied Microbiology. 85: 769-777.
- Shin, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita, M., Otsuka, Y. y S. Yamazaki. 1998. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology. 26: 407-411.
- Simmering, R. y M. Blaut. 2001. Pro –and prebiotics –the tasty guardian angels? Applied Microbiology and Biotechnology. 55: 19-28.
- Tomomatsu, H. 1994. Health Effects of Oligosaccharides. Food Technology. 61-63.
- Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W. y G. R. Gibson. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discovery Today. 8 (15): 692-699.
- van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T. y E. van den Heuvel. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). British Journal of Nutrition. 81: 121-132.
- Voragen, G. J. A. 1998. Technological aspects of functional Food-related carbohydrates. Trends in Food Science and Technology. 9: 328-335.

- Walzem, L. R., Dillard, J. C. y J. B. German. 2002. Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: GAT We Know May Overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42 (4): 353-375.
- Wang, X. y G. R. Gibson. 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 373-380.
- Weng, A. Z., Iglesias, H. B., Abreu, O. M. y J.R. Beltrán. 2004. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 42 (1): 1-7
- Yakult Oligomate 55[®] (Bifidus growth-promoting substance). Yakult Pharmaceutical Industry Co., LTD.
- Yun, W. J. 1996. Fructooligosaccharides: Ocurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 107-117.
- Zalán, Z., Németh, E., Baráth, A. y A. Halász. 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*. 43 (3): 219-225.

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

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

Iztapalapa, D. F., a 22 de marzo de 2007

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

Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli* en un sistema de simulación del tracto intestinal.

Que presentó

I.B.I. Ivonne Figueroa González

Director:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

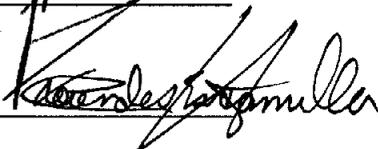


Jurado:

Dr. José Mariano García Garibay (Presidente)



Dra. Ma. de Lourdes Escamilla Hurtado (Secretario)



Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano (Vocal)



Dr. Humberto Hernández Sánchez (Vocal)