

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Iztapalapa

Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Biotecnología

**Estudio de prebióticos en el crecimiento de bacterias probióticas comerciales y
en la síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana**

Tesis que presenta

M. B. Ivonne Figueroa González

Para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Directora

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero.

Asesores

Dr. José Mariano García Garibay.

Dr. Humberto Hernández Sánchez.

México, D.F.

Marzo, 2010

México, D.F., a 16 de marzo de 2010

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

Estudio de prebióticos en el crecimiento de bacterias probióticas comerciales y en la síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana

Que presentó

M.B. Ivonne Figueroa González

Directora:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Jurado:

Dr. José Mariano García Garibay (Presidente)

Dra. María de Lourdes Pérez Chabela (Secretario)

Dra. María de Lourdes Escamilla Hurtado (Vocal)

Dr. Humberto Hernández Sánchez (Vocal)

Créditos institucionales

Esta Tesis fue elaborada en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero (UAM-Iztapalapa) y la asesoría de los doctores José Mariano García Garibay (UAM-Iztapalapa) y Humberto Hernández Sánchez (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN). La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el No. de Beca 203410.

Agradecimientos

Deseo agradecer a mis padres Lilia y César el apoyo invaluable que me han brindado durante todos estos años, sin ustedes no hubiera sido posible volver mi sueño realidad. Gracias por este logro tan maravilloso.

Agradezco especialmente a mi comité tutorial, al Dr. Mariano García Garibay por el valioso apoyo que me ha brindado y al Dr. Humberto Hernández Sánchez por haber formado parte de este trabajo y por sus valiosos consejos. A la Dra. Lourdes Pérez Chabela, muchas gracias por su valiosa colaboración. A la Dra. Lourdes Escamilla, muchas gracias por haber aceptado colaborar desde hace mucho tiempo en este trabajo y por esos momentos de plática tan maravillosos que me han enseñado a ir siempre un paso más allá.

A la Mtra. Lorena Gómez le agradezco esos momentos de plática y apoyo que siempre me brindó, a la Dra. Judith Jiménez muchas gracias por estar conmigo. A la Dra. Gabriela Rodríguez quiero agradecerle su disposición para brindar en cualquier momento una frase de apoyo, ayuda y amistad.

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Alma Cruz porque a lo largo de estos años me ha enseñado lo valiosa que puede ser una amistad. Le doy las gracias por haberme dirigido y apoyado hasta el último momento de este trabajo que hoy logramos concluir y le digo sinceramente que sin Ud. nunca lo hubiera logrado. Espero en este nuevo camino que ahora empiezo tenga la fortuna de encontrarla nuevamente.

A mis compañeros de la Planta Piloto 2; Nataly, Becky, Tatiana, Aracely, Erick, Javier, muchas gracias por la compañía y a poyo. A mi gran amigo Roberto Zúñiga, sabes que eres como un hermano para mí, muchas gracias por tu amistad.

Claudia Figueroa, te doy las gracias porque has sido el mayor de mis apoyos durante todo este tiempo, quiero que sepas que sin ti esto nunca hubiera sido posible. No tengo palabras para agradecerte que me hayas acompañado durante tanto tiempo brindándome una hermosa amistad, sabes que eres como una hermana para mí.

A Diana Lluís, me alegra que el paso por la PP2 me haya dejado una amistad tan sincera como la tuya, muchas gracias por todas esas pláticas y por el apoyo que me has brindado.

A mi hermano Josué, gracias porque siempre has sido mi mejor compañía, eres el mejor de los gemelos que me hubiera podido acompañar.

Quiero dedicar esta tesis a dos personas que han sido muy importantes en mi vida. A mi abuelo Cuauhtémoc, agradezco a la vida el haberme permitido disfrutarte durante tantos años, espero que sean muchos más, gracias por enseñarme a ver la vida con alegría, este trabajo es para ti. A Guillermo, muchas gracias por haberme acompañado y apoyado durante este tiempo sabes que eres lo más importante para mí, te amo.

Contenido

	Página
Créditos institucionales	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Resumen	ix
Summary	x
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	2
2.1. Probióticos	3
2.2. Prebióticos	5
2.3. Producción de compuestos antimicrobianos	9
2.4. Simbióticos	15
Capítulo 3. Justificación	18
Capítulo 4. Objetivos	19
Capítulo 5. Hipótesis	20
Capítulo 6. Metodología	21
6.1. Aislamiento de cepas probióticas	22
6.2. Identificación de microorganismos aislados de productos comerciales ...	22
6.3. Asimilación de prebióticos	26
6.4. Producción de compuestos antimicrobianos	27
6.5. Análisis estadístico	29
Capítulo 7. Resultados	30
7.1. Aislamiento de cepas probióticas	31
7.2. Identificación de microorganismos aislados de productos comerciales ...	33
7.3. Asimilación de prebióticos	37
7.4. Producción de compuestos antimicrobianos	46
Capítulo 8. Conclusiones	53
Capítulo 9. Referencias	54
Capítulo 10. Publicación científica	61

Índice de figuras

Figura 2.1. Estructura de la inulina	7
Figura 2.2. 4'-galactosil-lactosa; componente principal de los TOS	8
Figura 2.3. Estructura química de la lactulosa	9
Figura 2.4. Producción de AGCC en el colon	11
Figura 2.5. Oxidación de la membrana lipídica	12
Figura 2.6. Efectos antimicrobianos del H ₂ O ₂	13
Figura 2.7 Modo de acción de las bacteriocinas	15
Figura 2.8. Evolución de las tecnologías en el desarrollo de probióticos/prebióticos	16
Figura 7.1. Microorganismos probióticos aislados a partir de productos comerciales	32
Figura 7.2. Imágenes al microscopio de los microorganismos probióticos aislados	32
Figura 7.3. Gel de agarosa para comprobar la extracción de ADN	34
Figura 7.4. Gel de agarosa para la determinación del tamaño de los productos de PCR	34
Figura 7.5. Consumo de carbohidratos por bacterias probióticas aisladas	38
Figura 7.6 Crecimiento de microorganismos probióticos en diversos medios de cultivo	39
Figura 7.7. Crecimiento probiótico después de 32 h en diversos carbohidratos	40
Figura 7.8. Consumo de carbohidratos prebióticos después de 32 h	41
Figura 7.9. Índice prebiótico de diversos carbohidratos	46
Figura 7.10. Actividad prebiótica de diversos carbohidratos	46

Índice de tablas

Tabla 2.1. Bacteriocinas producidas por BAL	14
Tabla 2.2. Estudios con bacterias probióticas utilizando prebióticos como sustrato	17
Tabla 6.1. Volumen de los componentes para muestras de electroforesis	23
Tabla 6.2. Mezcla de reacción para la amplificación de ADN	24
Tabla 6.3. Condiciones para la amplificación de ADN mediante PCR	24
Tabla 6.4. Tratamientos para la identificación de sustancias antimicrobianas	29
Tabla 7.1. Condiciones para el aislamiento de bacterias probióticas	31
Tabla 7.2. Morfología colonial de los microorganismos aislados	32
Tabla 7.3. Comparación entre identificación por API 50 CHL y por extracción de ADN y PCR	36
Tabla 7.4. Rendimiento prebiótico	43
Tabla 7.5. Tasas de crecimiento	43
Tabla 7.6. Tiempo de duplicación	44
Tabla 7.7. Producción de AGCC	48
Tabla 7.8. Producción de H ₂ O ₂	48
Tabla 7.9. Inhibición por compuestos antimicrobianos	49
Tabla 7.10. Inhibición por bacteriocinas	51

Resumen

En este trabajo se determinó el efecto prebiótico de diversos carbohidratos (lactulosa, inulina y Oligomate 55) en el crecimiento de bacterias probióticas, para ello, se establecieron diversos parámetros de comparación como son: el índice prebiótico (I_{preb}), el rendimiento prebiótico (Y_{preb}) y la actividad prebiótica (A_{preb}). Adicionalmente, se observó el efecto prebiótico sobre los microorganismos identificados como *L. casei*, *L. casei* Shirota, *L. casei* MB65, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* KLDS para la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), H_2O_2 y bacteriocinas.

Los resultados obtenidos, mostraron que los prebióticos evaluados estimularon el crecimiento de los probióticos, siendo el mayor Y_{preb} de 10.2×10^7 ufc de *L. helveticus*/mg de inulina consumida. De igual forma, el mayor estímulo prebiótico fue obtenido por el Oligomate 55 sobre *L. rhamnosus* KLDS con un I_{preb} de 7.22 y una A_{preb} de 6.6.

Se comprobó la producción de compuestos antimicrobianos con todos los carbohidratos prebióticos ya que se observó la presencia de AGCC en una concentración final mínima de 31.71 mg/mL en lactosa (control) y de 161.21 mg/mL en Oligomate 55. La máxima concentración de H_2O_2 (343.5 μ g/mL) se obtuvo con glucosa y la mínima (1.3 μ g/mL) con lactulosa. Finalmente, se demostró la presencia de bacteriocinas que presentaron una inhibición de hasta 54% sobre el crecimiento de bacterias indicadoras (*E. coli* K12, *L. innocua* ATCC 33090 y *M. luteus* CDBB-B-1018).

Summary

The aim of this work was to assess the prebiotic effect of several carbohydrates on the growth of probiotic bacteria. The prebiotic effect of lactulose, inulin and Oligomate 55 was evaluated by means of the prebiotic index (I_{preb}), the prebiotic yield (Y_{preb}) and the prebiotic activity (A_{preb}). Additionally, it was evaluated the prebiotic effect on the production of short-chain fatty acids (SCFA), H_2O_2 and bacteriocins by microorganisms identified as *L. casei*, *L. casei* Shirota, *L. casei* MB65, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* GG and *L. rhamnosus* KLDS.

The results showed that the tested prebiotics improved the growth of all probiotic bacteria, Y_{preb} (10.2×10^7 cfu/mg of inulin consumed). In the same way, the highest prebiotic effect was obtained with the *L. rhamnosus* KLDS-Oligomate 55 pair (I_{preb} of 7.22 and A_{preb} of 6.6).

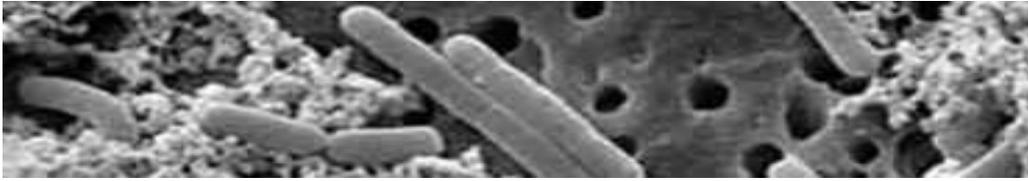
Finally, it was observed that antimicrobial compounds were produced in presence of all prebiotic carbohydrates. The final concentrations of SCFA with Oligomate 55 were up to 5-fold higher than control tests. On the other hand, maximum H_2O_2 concentration (343.5 $\mu\text{g/mL}$) was obtained with glucose. The minimum concentration was obtained with lactulosa (1.3 $\mu\text{g/mL}$). Finally, the tested prebiotics also stimulated the production of bacteriocins, obtaining growth inhibition of up to 54% for several indicator bacteria (*E. coli* K12, *L. innocua* ATCC 33090 and *M. luteus* CDBB-B-1018).

1. Introducción

En la actualidad la alimentación no es sólo una función vital por lo que se han ido desarrollando nuevos alimentos que no sólo buscan satisfacer las necesidades nutricionales del ser humano, sino brindar además beneficios sobre la salud del mismo. Los consumidores están altamente interesados en incrementar su salud personal, y esperan que los alimentos que ingieren sean saludables y capaces de prevenir enfermedades (Tuohy *et al.*, 2003). Aunque el concepto de alimentos funcionales se introdujo hace varios años con Hipócrates y su consigna “Que el alimento sea tu medicina”, las pruebas han empezado a soportar la hipótesis de que la dieta juega un papel importante en la modulación de funciones fisiológicas en el cuerpo. El objetivo actual más prometedor es el tracto gastrointestinal humano y su microbiota residente (Vasiljevic y Shah, 2008).

Un gran número de efectos sobre la salud son mediados por la microbiota intestinal y la dieta es la llave para influir en su composición y actividad mediante la ingestión de probióticos y prebióticos (Simmering y Blaut, 2001). Es función de la microbiota intestinal, fundamentalmente las bifidobacterias y los lactobacilos, la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles. Estos productos crean un ambiente en donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse. (Cagigas y Blanco 2002). Se ha incrementado el uso de compuestos alimenticios denominados prebióticos que estimulen el crecimiento de las bacterias probióticas ya que son el sustrato fundamental de las mismas y además tienen un gran potencial como agentes para producir o mantener una microbiota intestinal que desarrolle actividades benéficas para el huésped (Simmering y Blaut, 2001; Roberfroid, 2007).

Dado que los alimentos funcionales pueden contener probióticos, prebióticos o ambos es importante entender las propiedades benéficas de estos productos y de cómo mejoran la salud humana (Saulnier *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que ejercen distintos carbohidratos prebióticos sobre el crecimiento de bacterias probióticas aisladas de productos comerciales y su producción de sustancias antimicrobianas.



2. Antecedentes

2.1. Probióticos

2.2. Prebióticos

2.3. Producción de compuestos antimicrobianos

2.4. Simbióticos

El concepto de salud intestinal se ha convertido en el objetivo para el desarrollo de alimentos funcionales que pueden contener probióticos, prebióticos, simbióticos y otros componentes de la dieta que alcanzan el colon y afectan el ambiente, la composición de la microbiota, así como la fisiología del colon, generando diversos beneficios a la salud (Hijova y Chmelarova, 2007).

2.1. Probióticos

En años recientes, ha existido un aumento en la investigación sobre probióticos, así como un crecimiento en el interés comercial del concepto de “probióticos” que ha derivado en avances significativos en nuestro entendimiento y habilidad para caracterizar y utilizar organismos probióticos específicos (Senok *et al.*, 2005). Los probióticos se han definido como “organismos vivos que al ingerirse afectan benéficamente al hospedero mejorando el balance intestinal” (Simmering y Blaut, 2001). Una gran variedad de especies y géneros pueden ser considerados como probióticos potenciales; sin embargo, comercialmente, las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más importantes (Vasiljevic y Shah, 2008).

Las BAL son microorganismos Gram-positivos, prefieren las condiciones anaerobias pero son aerotolerantes, ácido tolerantes, y estrictamente fermentativos, produciendo ácido láctico como producto principal. Los géneros más importantes son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y *Bifidobacterium*. Las BAL se dividen generalmente en dos grupos de acuerdo a la forma de metabolizar los carbohidratos. El grupo homofermentativo formado por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y varios *Lactobacillus* que utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (glucolítica) para transformar una fuente de carbono principalmente en ácido láctico. A diferencia de los homofermentadores, las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂, etanol o acetato a partir de la utilización de la vía de la fosfoetolasa. Entre las bacterias de este grupo se incluyen *Leuconostoc*, *Weisella* y algunos *Lactobacillus* (Ranadheera *et al.*, 2010).

Los cultivos probióticos han sido explotados extensivamente por la industria como una herramienta para el desarrollo de nuevos productos funcionales. Si bien se ha estimado que existen en el mundo aproximadamente 70 productos comercializados que contienen probióticos (2004), la lista se expande constantemente. Tradicionalmente, los probióticos han

sido incorporados en el yogurt; sin embargo, recientemente se han introducido en otros productos como mayonesas, comestibles y carnes así como productos de consumo diario como los quesos y aderezos (Vasiljevic y Shah, 2008).

La importancia de ciertas características tecnológicas y fisiológicas de las cepas probióticas fue observada hace varios años. Diversos criterios se han reconocido y/o sugerido para que los microorganismos probióticos sean efectivos (Kaur *et al.*, 2002; Vasiljevic y Shah, 2008):

- a) Criterios de seguridad
 - Tener un origen seguro
 - No ser carcinogénicos o patogénicos
- b) Criterios tecnológicos
 - Ser cepas estables genéticamente
 - Presentar viabilidad durante el proceso y el almacenamiento de productos
 - Tener buenas propiedades sensoriales
- c) Criterios funcionales
 - Poseer la habilidad de adherirse a las células intestinales
 - Tener tolerancia a los ácidos y jugos gástricos
 - Presentar efectos a la salud previamente validados y documentados
- d) Criterios fisiológicos
 - Presentar actividad antagonista hacia patógenos intestinales
 - Favorecer la absorción o degradación de la lactosa
 - Inmunomodulación

Con el fin de que los probióticos expresen de manera adecuada sus propiedades funcionales, deben ser mantenidos en una forma adecuada durante el desarrollo, producción y comercialización de los diversos productos funcionales. La viabilidad y actividad de los probióticos ha sido siempre un prerrequisito para lograr beneficios a la salud. Estos factores pueden verse afectados antes, durante y después del proceso debido a la exposición a diferentes factores de estrés como son la presencia de ácidos orgánicos durante su cultivo, agotamiento de nutrientes, presencia de compuestos antimicrobianos, congelamiento, etc. Como alternativa, la viabilidad de los probióticos tanto en los productos como en el tracto intestinal puede mejorarse con la adición de un prebiótico apropiado. La función de los

prebióticos por definición, es la estimulación selectiva del crecimiento de un número limitado de bacterias benéficas, un gran número de prebióticos ha sido utilizado como herramienta para mejorar la actividad y supervivencia probiótica (Vasiljevic y Shah, 2008).

2.2. Prebióticos

En la actualidad, diversos estudios involucran oligosacáridos que pueden ser prebióticos potenciales y que pueden clasificarse de acuerdo a sus constituyentes químicos y grado de polimerización, e incluyen manooligosacáridos, pectiologosacáridos, oligosacáridos de la soya, isomaltooligosacáridos, xilooligosacáridos y lactulosa. Sin embargo, recientemente, la mayoría de los estudios de prebióticos se ha enfocado a la inulina, los fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS) y galactooligosacáridos transgalactosilados (TOS) (Macfarlane *et al.*, 2008)

Los FOS, la inulina, los GOS, y otros carbohidratos relacionados han recibido una atención considerable debido a los beneficios que pueden proporcionar a quien los consume. Estos, llamados carbohidratos prebióticos han sido definidos como ingredientes fermentables selectivamente que permiten cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal proporcionando beneficios sobre la salud y bienestar del hospedero (Huebner *et al.*, 2007). Los prebióticos son importantes a causa de :(i) la creciente convicción de que se debe poseer una microbiota intestinal balanceada y saludable, (ii) la demostración de que los prebióticos pueden alterar la composición de la microbiota hacia un perfil más saludable, (iii) ser una alternativa a los probióticos, los cuales son difíciles de adicionar a los alimentos y (iv) los costos no muy elevados para la producción o extracción de los prebióticos actualmente en uso, que además de los efectos benéficos que aportan a la salud, son ingredientes funcionales de gran valor que se adicionan fácilmente a los productos dietéticos para mantener sus propiedades sensoriales (Macfarlane *et al.*, 2006).

Los criterios para clasificar un ingrediente alimenticio como prebiótico son: i) Resistencia a la acidez gástrica y la hidrólisis por enzimas de mamíferos, y a la absorción gastrointestinal, ii) Ser fermentados por la microbiota intestinal y iii) Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de aquellas bacterias que contribuyen al bienestar y la salud (Roberfroid, 2007).

La resistencia referida en el primer criterio no significa que necesariamente el prebiótico sea totalmente indigerible, pero se debe garantizar que una cantidad significativa esté disponible en el intestino (especialmente en el intestino grueso) y funcionar como sustrato de fermentación. Aunque todos los criterios son importantes, el tercero es el más difícil de cumplir. Los prebióticos más utilizados en la formulación de alimentos son la inulina y los TOS ya que alteran claramente el balance de la microbiota incrementando el número de bifidobacterias y lactobacilos (Roberfroid, 2007). Para que la evaluación de los carbohidratos prebióticos sea completa, se requiere de la comprobación de cada uno de los efectos mediante técnicas *in vivo*, sin embargo, en la actualidad diversos candidatos a prebióticos son utilizados en una amplia gama de alimentos (Wang, 2009).

2.2.1. Fructooligosacáridos e inulina

Los FOS pueden encontrarse en una amplia variedad de frutas, vegetales y cereales. Son mezclas de cadenas de azúcares formados por una molécula de glucosa y moléculas de fructosa (Losada y Olleros, 2002). Se encuentran disponibles comercialmente en Japón, Estados Unidos, Europa y recientemente en México. Generalmente, 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. Otro método de obtención es la síntesis a partir de sacarosa usando la enzima transfructosilasa (Escalante, 2001).

La inulina (Figura 2.1) es un polisacárido de FOS, formada por 3-60 unidades de fructosa en cadenas lineales unidas por un enlace $\beta(1-2)$ y con un residuo de glucosa al final de la cadena. Se encuentra generalmente en plantas, bacterias y algunos hongos. La inulina no es digerida en el intestino delgado, pero partes de su cadena pueden ser digeridas en el intestino grueso por la microbiota. La inulina y los FOS se disuelven fácilmente en agua caliente (80°C) pero son poco solubles en agua fría y alcohol. Son compuestos muy estables, no poseen propiedades sensoriales indeseables a excepción de cierta dulzura. Los FOS y la inulina llegan al intestino grueso sin ser digeridos; así, poseen las propiedades de los prebióticos (Thammarutwasik *et al.*, 2009).

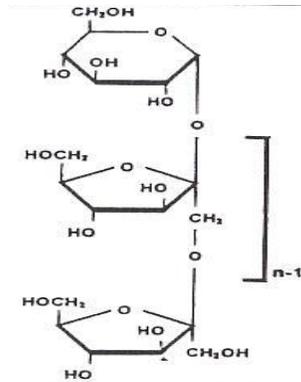


Figura 2.1. Estructura de la inulina (Swennen *et al.*, 2006).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que es capaz de estimular el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, al mismo tiempo que los niveles de bacterias potencialmente patógenas como *Clostridium spp.* y *Escherichia coli* disminuyen (Escalante, 2001). Es así, que a los FOS se les han asociado diversos efectos benéficos sobre la salud. Los FOS representan un nutriente selectivo para los microorganismos benéficos y tienen la capacidad de incrementar la efectividad de productos probióticos (Losada y Olleros, 2002).

2.2.2. Galactooligosacáridos

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. Los GOS no son digeridos por las enzimas intestinales y pueden llegar intactos al intestino grueso. Esto es porque los GOS tienen una configuración β y las enzimas intestinales son más específicas para enlaces glicosídicos α . En el colon pueden ser hidrolizados por los microorganismos presentes, produciendo ácidos grasos de cadena corta, como acético, propiónico y butírico, y gases como H_2 , CH_4 y CO_2 . Existen otros compuestos generados por la hidrólisis de los GOS como el lactato, que puede mejorar el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos (Thammarutwasik *et al.*, 2009).

2.2.2.1 Oligomate 55

Los TOS 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 TOS, en los cuales el principal componente es la 4'-galactosil-lactosa (Figura 2.2). Otros componentes son lactosa y monosacáridos (Swennen *et al.*, 2006).

El Oligomate 55 contiene al menos 55% de 4' y 6'-galactosil-lactosa. Estos TOS 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 TOS son más estables que los FOS. En experimentos *in vitro* se ha mostrado que los TOS 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 (Thammarutwasik *et al.*, 2009).

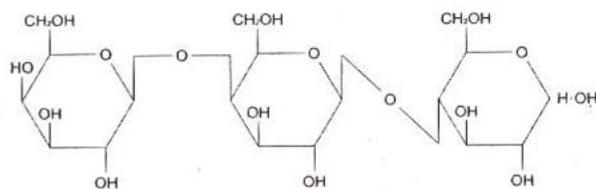


Figura 2.2. 4'-galactosil-lactosa; componente principal de los TOS (Swennen *et al.*, 2006).

2.2.2.2. Lactulosa

La lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructosa) es un azúcar sintético, que en contraste con otros prebióticos no se encuentra de manera natural en ningún alimento pero se genera a partir de la lactosa durante el tratamiento térmico de la leche; la formación de lactulosa en leche depende de la temperatura y el tiempo del tratamiento así como del pH de la leche (Olano y Corzo, 2009). La lactulosa (Figura 2.3) también es producida enzimáticamente utilizando β -galactosidasas de diferentes fuentes *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae*, *Sulfolobus solfataricus* y *Pyrococcus furiosus*. La lactulosa es soluble en agua, ligeramente soluble en metanol e insoluble en éter. No es hidrolizada o absorbida en el intestino delgado, pero puede ser fermentada por las bacterias en el intestino grueso, lo que incrementa la población de los microorganismos nativos. Este hecho ayuda a prevenir el cáncer de colon,

reducir los patógenos y mejorar la inmunidad. Además, la lactulosa puede ser metabolizada selectivamente por bifidobacterias y lactobacilos, favoreciendo la formación de CO₂, H₂O₂, ácidos grasos de cadena corta (Thammarutwasik *et al.*, 2009).

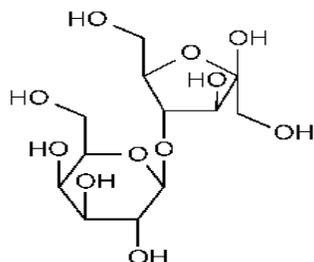


Figura 2.3 Estructura química de la lactulosa (Olano y Corzo, 2009)

2.3. Producción de compuestos antimicrobianos por bacterias probióticas

El modo de acción de las cepas probióticas tiende a ser multifactorial y, por la evidencia existente, parece ser específico para cada cepa. Los probióticos son capaces de inhibir a las bacterias patógenas, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de diferentes mecanismos (Tuohy *et al.*, 2003). El principal efecto antimicrobiano ejercido por las BAL es la producción de ácido láctico y la reducción del pH del medio. Además, las BAL producen varios compuestos antimicrobianos que pueden clasificarse en compuestos de bajo peso molecular, como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dióxido de carbono (CO₂), diacetilo (2,3-butanodiona), compuestos no caracterizados, y compuestos de alto peso molecular como bacteriocinas (Ammor *et al.*, 2006).

2.3.1. Ácidos grasos de cadena corta

Los carbohidratos que escapan a la digestión/absorción en el intestino delgado y los prebióticos son fermentados en el colon mejorando la producción de ácidos AGCC. Esto se ha asociado con la reducción en el riesgo de contraer ciertas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hijova y Chmelarova, 2007). Los AGCC afectan los procesos de transporte del epitelio colónico, la transducción de energía en colonocitos, crecimiento y diferenciación celular, el control hepático de los lípidos, el metabolismo de carbohidratos, y proveen de energía a los músculos, riñones, corazón y cerebro (Macfarlane *et al.*, 2008).

Los AGCC son ácidos grasos orgánicos con 1 a 6 átomos de carbono y son los principales aniones que se generan a partir de la fermentación bacteriana de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas y péptidos. La fermentación involucra una variedad de reacciones y procesos metabólicos que forman parte del rompimiento microbiano anaerobio de la materia orgánica, para la obtención de energía necesaria para el crecimiento y mantenimiento microbiano así como la formación de productos para uso del hospedero. Los principales productos finales son AGCC, gases (CO_2 , CH_4 y H_2) y calor. Varios estudios poblacionales han mostrado que la producción de AGCC por la microbiota intestinal es de la siguiente forma acetato>propionato>butirato en una relación molar aproximada de 60:20:20, respectivamente (Hijova y Chmelarova, 2007).

La producción de AGCC es uno de los procesos fisiológicos más importantes mediado por los microorganismos colónicos. La gran mayoría de estos metabolitos son absorbidos en el intestino grueso, permitiendo al hospedero ganar energía de los alimentos no digeridos en la parte superior del tracto intestinal (Macfarlane *et al.*, 2008). Los carbohidratos son fermentados (Figura 2.4) principalmente por bacterias sacarolíticas en el colon, produciendo AGCC lineares, CO_2 y H_2 , y ambos, la presencia de carbohidratos en el colon y su fermentación, pueden alterar la fisiología colónica. La fermentación de proteínas y aminoácidos por bacterias proteolíticas genera AGCC ramificados, CO_2 , CH_4 y H_2 , fenoles y aminas (Hijova y Chmelarova, 2007).

La fermentación *in vitro* de AGCC por bacterias intestinales ha mostrado que los polisacáridos individuales son degradados a diferentes velocidades. Sin embargo, ya que más del 95% de los AGCC son absorbidos en el intestino, la cuantificación de estos metabolitos en las heces no dice mucho acerca de la fermentación de diferentes carbohidratos. Sin embargo, estudios *in vitro*, particularmente los que involucran heces, son modelos útiles para el estudio de los procesos de fermentación. A concentraciones de 10 g/L, los FOS y los GOS han incrementado la formación de acetato y butirato en reactores con pH controlado, con una acumulación transitoria de lactato y succinato. La formación de acetato y lactato es consistente con el metabolismo de bifido bacterias y lactobacilos, más no con la producción de butirato (Macfarlane *et al.*, 2008).

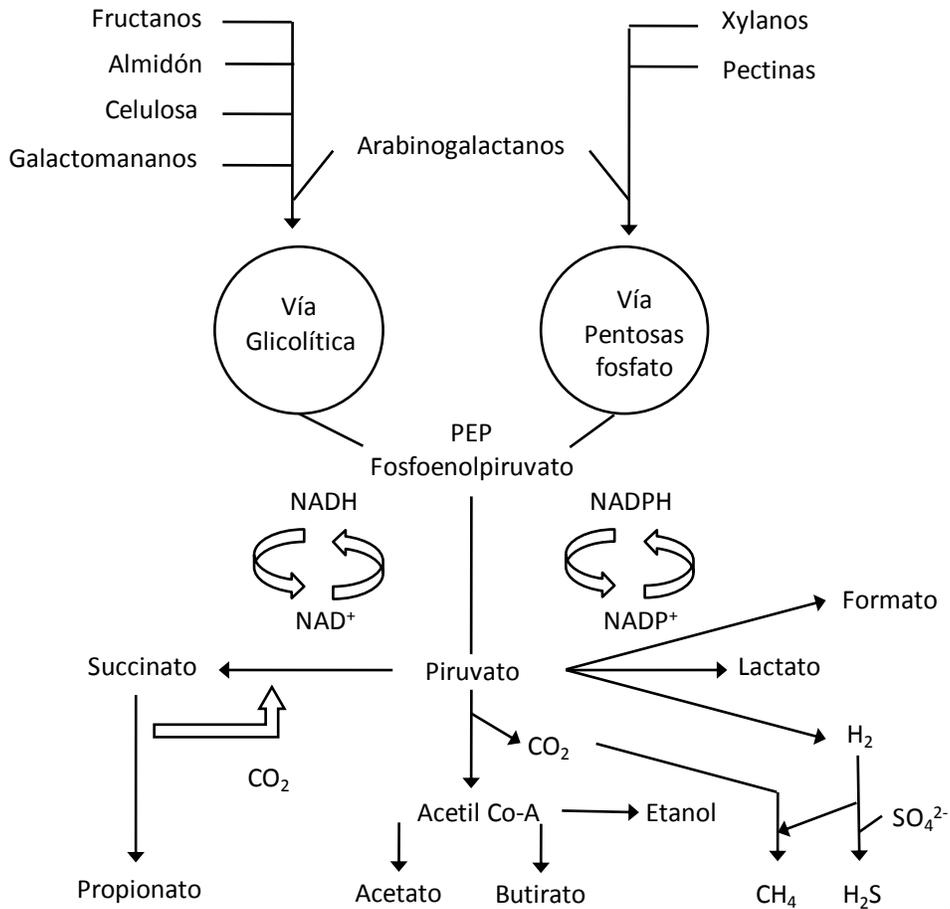


Figura 2.4. Producción de AGCC en el colon (Hijova y Chmelarova, 2007).

Estudios con quimiostatos utilizando cultivos puros de bacterias sacarolíticas de la biota intestinal demostraron que la disponibilidad de carbono y la tasa de crecimiento afectan fuertemente los resultados de la fermentación (Macfarlane y Macfarlane, 2003). De los AGCC producidos por las bacterias probióticas, el ácido láctico ha mostrado funcionar como un antimicrobiano natural. El ácido láctico es capaz de inhibir el crecimiento de diversas bacterias contaminantes de los alimentos incluyendo especies Gram-negativas. Entre otros ácidos orgánicos, el ácido láctico es reconocido como un biopreservativo de productos fermentados. La acción antimicrobiana del ácido láctico es ampliamente, pero no totalmente, asignada a la habilidad de su forma disociada de penetrar la membrana citoplasmática, resultando en una disminución del pH intracelular (Alakomi *et al.*, 2000).

2.3.2. Peróxido de hidrógeno

La habilidad de producir H_2O_2 está generalizada entre las bacterias ácido lácticas. En algunos cultivos el H_2O_2 puede acumularse hasta niveles que resultan autoinhibitorios o inhibitorios para otras bacterias. Algunos investigadores han sugerido que la producción de H_2O_2 por bacterias ácido lácticas involucra acciones oxidativas en los azúcares y compuestos relacionados. La producción de H_2O_2 puede ser benéfica para la preservación de alimentos y la prevención del crecimiento de patógenos (Villegas y Gilliland, 1998).

El efecto antimicrobiano del H_2O_2 produce la destrucción de la membrana celular al perder su impermeabilidad y fluidez por alteración de los gradientes iónicos, con lo que se pierde su capacidad de barrera selectora y la célula muere (Figura 2.5). Esta ruptura resulta de la oxidación de los grupos sulfhidrilos provocando la desnaturalización de diversas enzimas, y de la oxidación de los lípidos de la membrana incrementando su permeabilidad dando lugar a productos tóxicos de degradación. El H_2O_2 puede también ser el precursor de radicales libres (Figura 2.6) que son bactericidas como el superóxido (O_2^-) y el hidroxilo (OH^\cdot), los cuales pueden dañar el ADN ya que la dimerización del ADN se mantiene en las sucesivas duplicaciones de la célula, repitiéndose los errores de lectura del código genético, dando lugar a mutaciones (Ammor *et al.*, 2006).

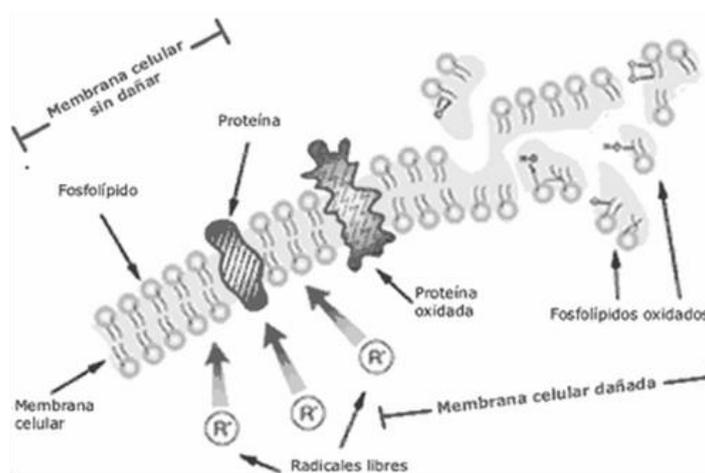


Figura 2.5. Oxidación de la membrana lipídica (Helander *et al.*, 1997).

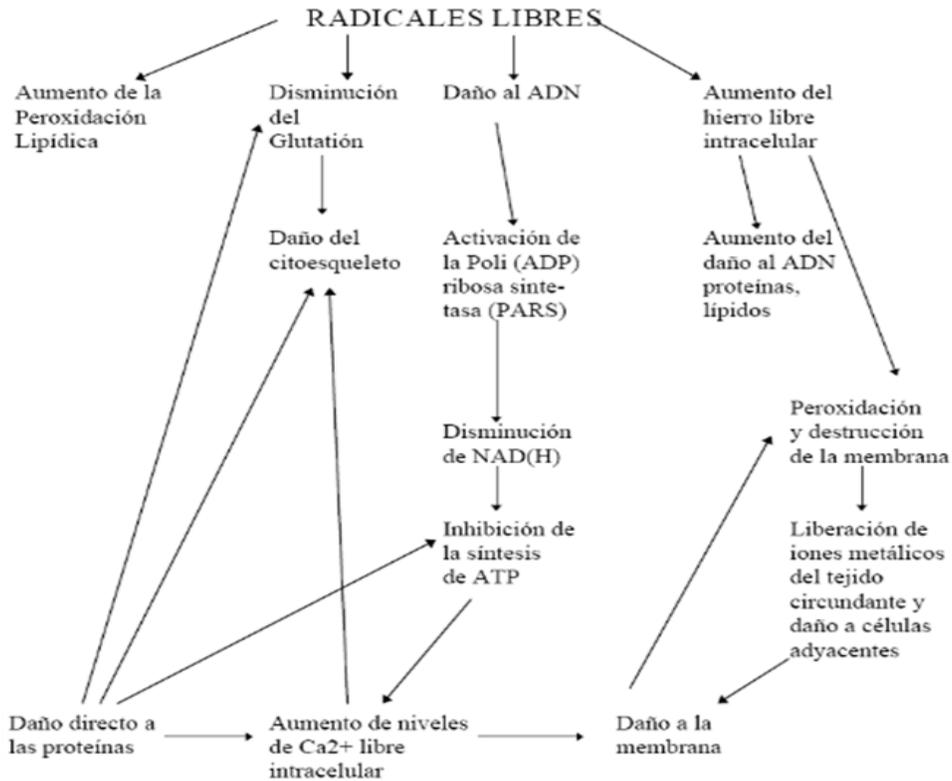


Figura 2.6. Efectos antimicrobianos del H₂O₂ (Helander *et al.*, 1997)

2.3.3. Bacteriocinas

Las bacteriocinas producidas por BAL (Tabla 2.1) son péptidos antimicrobianos pequeños o proteínas pequeñas que poseen actividad contra bacterias Gram-positivas relacionadas al microorganismo productor, sin olvidar considerar que las células productoras son inmunes a sus propias bacteriocinas. El espectro antibacteriano generalmente incluye organismos que causan deterioro a los alimentos y microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Además de su acción antimicrobiana contra bacterias indeseables se cree que las bacteriocinas contribuyen a favorecer la competitividad de la célula productora (De Vuyst y Leroy, 2007).

La acción antimicrobiana de las bacteriocinas involucra el incrementar la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las células blanco, lo que lleva a la liberación de partículas citoplasmáticas, despolarización del potencial de la membrana y eventualmente a la muerte celular (Simova *et al.*, 2009). Las bacteriocinas pueden agruparse en base a su estructura, pero

también en base a su modo de acción (Figura 2.7). Algunos miembros de la clase I han mostrado tener un modo de acción dual ya que pueden unirse a los lípidos de la membrana e impedir su regeneración, también pueden usar los lípidos para acoplarse a la membrana e iniciar un proceso de inserción y formación de poros lo que ocasiona una muerte celular rápida. En general, las bacteriocinas de la clase II poseen una estructura de hélice anfifílica que les permite insertarse en la membrana de la célula causando despolarización y muerte. Las proteínas bacteriolíticas grandes (bacteriolisinas) pertenecientes a la clase III pueden actuar directamente en la pared celular ocasionando lisis celular y muerte (Cotter *et al.*, 2005). Las bacteriocinas clase IV son generalmente proteínas termoestables, de alto peso molecular que contienen moléculas lipídicas en su estructura y por lo general son resistentes a valores extremos de pH y altas temperaturas (Gautam y Sharma, 2009).

Tabla 2.1. Bacteriocinas producidas por BAL (Cintas *et al.*, 2001).

Bacteriocina	Microorganismo productor
Clase I (lantibióticos)	
Nisina A	<i>Lactococcus lactis</i>
Nisina Z	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactocococina	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ481
Lactocina S	<i>Lactobacillus sakei</i> L45
Clase IIa	
Pediocina PA1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC-1.0
Acidocina A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201
Curvacina A	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Sakacina A	<i>Lactobacillus sakei</i> LB706
Clase IIb	
Acidocina J1132	<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132
Lactacina F	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088
Plantaricina S	<i>Lactobacillus plantarum</i> LCPO10
Clase IIc	
Acidocina	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46
Enterocina P	<i>Enterococcus faecium</i> P13
Clase II d	
Diacetina B	<i>Lactococcus lactis</i> UL720
Acidocina 8912	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK8192
Péptido A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LF221
Péptido B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LF221
Clase III	
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481
Caseicina 80	<i>Lactobacillus casei</i> B80
Enterolisina	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG23333
Clase IV	
Thuricina	<i>Bacillus thuringiensis</i> NEB17

Aunque el blanco de las bacteriocinas también pueden ser los lipopolisacáridos de la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas, generalmente sólo son activas en contra de células Gram-positivas (Caplice y Fitzferald, 1999). Hasta ahora sólo se han reportado algunas cuantas bacteriocinas de las BAL que tienen actividad sobre bacterias Gram-negativas y que son producidas por *L. plantarum*, *L. paracasei* y *Lactococcus lactis* (Todorov y Dicks, 2005).

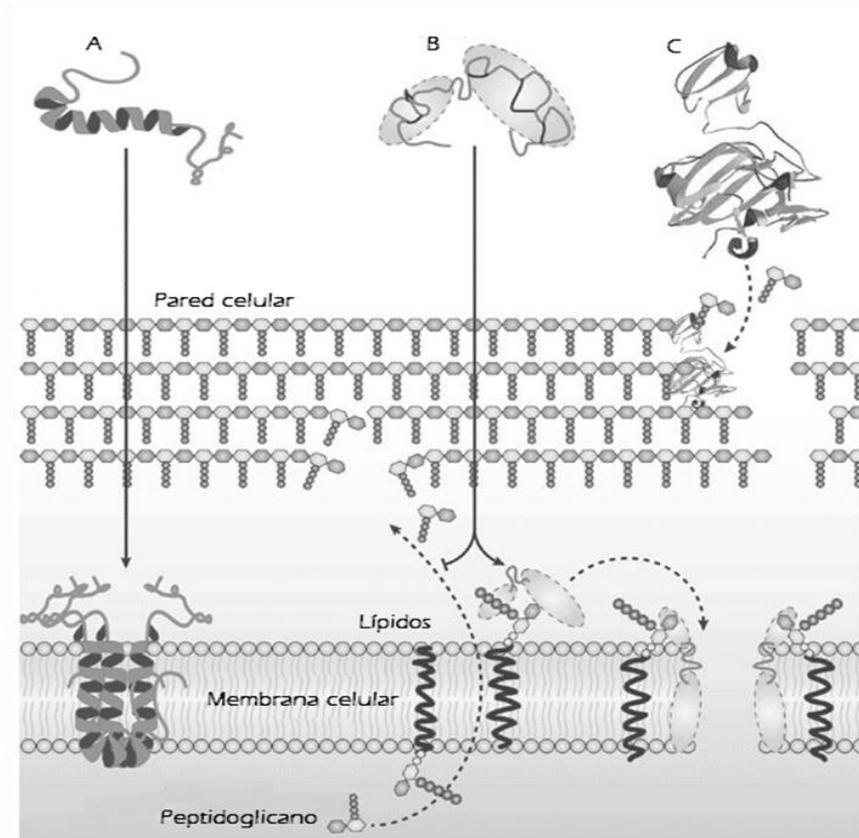


Figura 2.7. Modo de acción de las bacteriocinas. (A) Bacteriocinas clase I; (B) Bacteriocinas clase II y (C) Bacteriolisinas (Cotter, *et al.*, 2005).

2.4 Simbióticos

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 microbiota intestinal (Kneifel *et al.*, 2000). Las especies objetivo en la mayoría de las intervenciones dietéticas son las bifidobacterias y los lactobacilos y en los estudios (Tabla 2.2)

se ha confirmado que los prebióticos son un instrumento útil en la manipulación de la microbiota colónica (Rycroft *et al.*, 2001).

Los prebióticos podrían influenciar el crecimiento y supervivencia de los probióticos modificando el crecimiento y los metabolitos producidos por estos microorganismos. La interacción de probióticos y prebióticos puede favorecerse mediante la adaptación del probiótico al sustrato prebiótico antes del consumo. Esto, podría resultar en una ventaja competitiva para el probiótico si es consumido al mismo tiempo que el prebiótico (Figura 2.8).

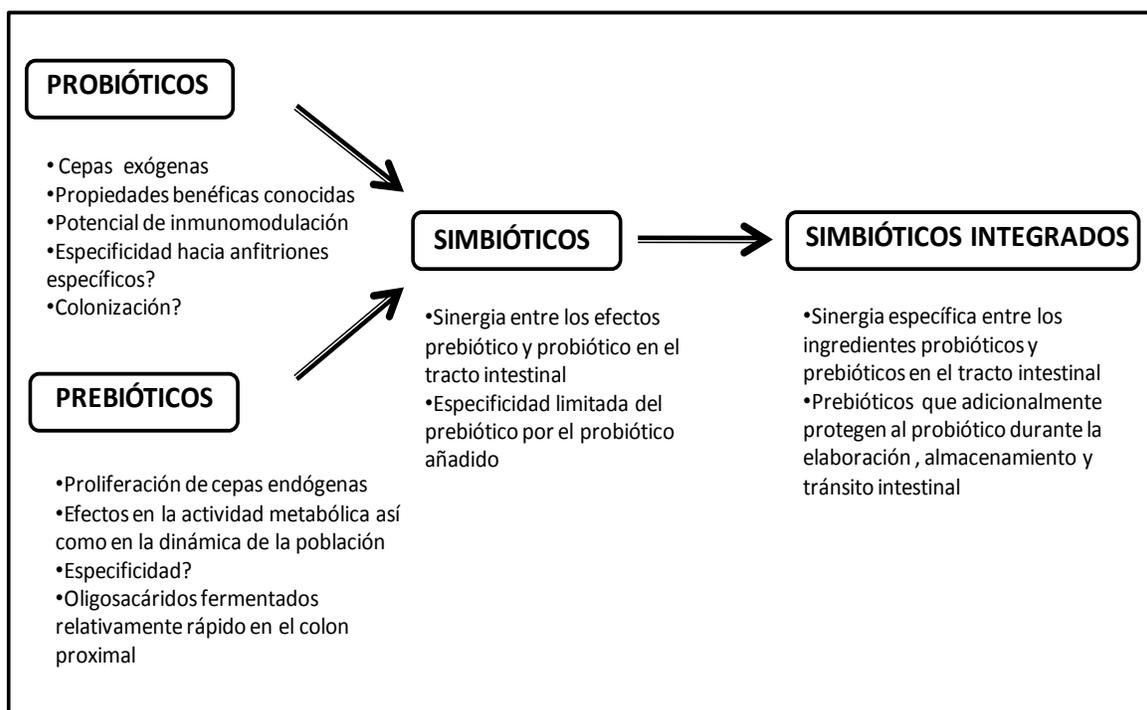


Figura 2.8. Evolución de las tecnologías en el desarrollo de probióticos/prebióticos (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

Tabla 2.2. Estudios con bacterias probióticas utilizando prebióticos como sustrato

Estudio	Desarrollo y resultados
Efecto de oligosacáridos prebióticos en el crecimiento y producción de bacteriocinas por bacterias ácido lácticas (Chen <i>et al.</i> , 2007)	Se evaluaron los efectos de 3 carbohidratos prebióticos (FOS, rafinosa y trealosa) en la producción de bacteriocinas por <i>L. animalis</i> C060203, <i>L. sakei</i> JCM1157, <i>E. durans</i> L28-1 y <i>E. faecium</i> MR006. Los resultados obtenidos mostraron que ambos carbohidratos pueden mejorar efectivamente la producción de bacteriocinas en comparación con la glucosa
Fermentación <i>in vitro</i> de xilo-oligosacáridos (XOS) por <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> (Moura <i>et al.</i> , 2007).	El objetivo de este trabajo fue analizar y comparar la capacidad de los (XOS) para mantener el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos. El crecimiento de las cepas de lactobacilos <i>L. brevis</i> y <i>L. fermentum</i> obtuvieron un crecimiento significativamente mayor en los prebióticos Xylo-Olig95, CC F15 y CC F16 con respecto al control. <i>L. brevis</i> aumentó su tasa de crecimiento consumiendo XOS.
Efecto de prebióticos en la viabilidad y crecimiento de probióticos en leche de soya (Yeo y Liong, 2009).	Se evaluó el efecto de prebióticos como maltodextrina, FOS, inulina, manitol y pectina en la viabilidad de seis bacterias probióticas. La leche de soya se adicionó con 10 g/L de cada prebiótico. De acuerdo con los resultados, todas las cepas estudiadas crecieron bien en la soya adicionada con prebióticos y su crecimiento se vio afectado significativamente de manera positiva, pero el efecto depende de la cepa en particular. La suplementación con FOS y manitol tuvo el mayor efecto prebiótico, siendo más notorio en <i>L. acidophilus</i> FTDC 8033. Sin embargo, también se observó en <i>Lactobacillus</i> sp. FTDC 2113,
Influencia de diversos oligosacáridos en el crecimiento y tolerancia de lactobacilos bajo diversas condiciones de estrés (Pan <i>et al.</i> , 2009).	Se investigó el efecto de cuatro oligosacáridos en la resistencia al calor y los jugos intestinales. Además, se analizó la utilidad de los oligosacáridos como fuente de carbono para los lactobacilos. Se evaluó el crecimiento de <i>L. plantarum</i> NIT202 y <i>L. acidophilus</i> NIT200. Los XOS fueron la mejor fuente de carbono para aumentar el crecimiento de las cepas, seguido de los FOS. Así mismo, los FOS y XOS mejoraron significativamente la viabilidad de las dos cepas en los fluidos intestinales.

3. Justificación

Existe una creencia generalizada de que los alimentos ingeridos pueden regular ciertas actividades metabólicas asociadas con los microorganismos intestinales, un cambio en la dieta tendrá un pequeño efecto en el total de la composición y estructura de las comunidades microbianas del tracto intestinal (Macfarlane *et al.*, 2008).

La flora intestinal en el humano guarda una estrecha relación con la salud del hospedero. Es posible manipularla para asegurar los beneficios sobre la salud humana por medio de dos aproximaciones dietéticas. La primera es la aproximación probiótica, mediante la cual bacterias vivas incorporadas a ciertos alimentos son administradas vía oral y son capaces de alcanzar el intestino delgado y el colon. Como consecuencia de su crecimiento y actividad metabólica, aportan al hospedero una serie de beneficios en su salud. La segunda, es el uso de prebióticos, mediante la cual se proporcionan fuentes de carbono específicas para bacterias probióticas residentes en los intestinos y que favorecen la proliferación selectiva de estas bacterias (Escalante, 2001).

Se han atribuido muchos beneficios sobre la salud al consumo de alimentos que contienen estas bacterias “amigables”. Sin embargo, la introducción de los prebióticos a la dieta, representa un nuevo reto para determinar los cambios específicos en la composición de la microbiota, así como muchos de los rasgos fisiológicos que pueden ser modificados por estos compuestos (Macfarlane *et al.*, 2008).

Por lo anterior, en este trabajo se evaluaron diversas combinaciones simbióticas para determinar de manera cualitativa y cuantitativa el efecto que ejercían diferentes carbohidratos prebióticos sobre el desarrollo y metabolismo de bacterias probióticas aisladas de productos comerciales con la finalidad de determinar si era posible aumentar los beneficios que estas bacterias ejercen sobre la salud humana.

4. Objetivos

4.1 General

- Evaluar el efecto de carbohidratos prebióticos sobre el crecimiento de bacterias probióticas aisladas de productos comerciales y conocer la producción de compuestos antimicrobianos de estos microorganismos.

4.2 Particulares

- Aislar cepas con propiedades probióticas a partir de productos comerciales.
- Evaluar el efecto de diversos prebióticos sobre el crecimiento de los microorganismos probióticos aislados a través de herramientas cuantitativas (I_{preb} , Y_{preb} y A_{preb}).
- Conocer el efecto de los carbohidratos prebióticos sobre la producción de compuestos antimicrobianos como AGCC, H_2O_2 y bacteriocinas.

5. Hipótesis

- El crecimiento de los microorganismos probióticos y su producción de metabolitos será beneficiado por la adición de prebióticos.



6. Metodología

- 6.1. Aislamiento de microorganismos probióticos
- 6.2. Identificación de microorganismos aislados de productos comerciales
- 6.3. Asimilación de prebióticos
- 6.4. Producción de compuestos antimicrobianos
- 6.5. Análisis estadístico

6.1. Aislamiento de cepas probióticas

Se utilizaron 6 productos comerciales que de acuerdo con PROFECO (2004) contienen los siguientes microorganismos:

- Bebida láctea fermentada Bio 4 de LALA (*L. casei* spp. *paracasei*)
- Leche fermentada Chamyto (*L. johnsonii* y *L. helveticus*)
- Cápsulas Culturelle (*L. rhamnosus* GG)
- Leche fermentada Yakult (*L. casei* Shirota)
- Leche en polvo NAN (*L. rhamnosus*)
- Leche Kultai (*L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium bifidus*)

Para el aislamiento de los microorganismos contenidos en los productos comerciales mencionados se tomaron muestras de 1 mL de cada uno de ellos, se realizaron diluciones (10^1 - 10^4) en agua peptonada (peptona de caseína 1% p/v, pH 7.2) y se sembraron en cajas Petri con agar MRS (De Man *et al.*, 1960) preparado de tres diferentes formas: agar MRS-NaCl (adición de 40g/L de NaCl; Agar MRS-pH 5.2 (ajuste del valor de pH del medio con HCl 1.0 N) y agar MRS. Las cajas se incubaron a dos temperaturas distintas por un periodo entre 24h y 72 h (37 y 42 °C), posteriormente se realizó una selección de los microorganismos a aislar tomando como base la morfología colonial (Tharmaraj y Shah, 2003).

6.2. Identificación de los microorganismos aislados de productos comerciales

6.2.1. Identificación de los microorganismos aislados mediante API 50 CH

Para realizar la identificación de los microorganismos aislados, se utilizó la prueba API 50 CH (bioMérieux, Inc, USA). Los microorganismos a identificar se incubaron en caldo MRS a 37°C por 24 h. Posteriormente se realizó una tinción de Gram para verificar la pureza de los inóculos. Las células fueron colectadas por centrifugación (14,000 rpm, 15 min, 4°C) y re-suspendidas en medio API 50 CHL (bioMérieux, Inc, USA) para la prueba.

En cada uno de los microtubos de las placas API 50CH se colocaron 200 µL de agua destilada para formar una atmósfera húmeda y 200 µL de solución bacteriana de cada uno de los microorganismos a identificar. Finalmente se cubrieron con 180 µL de aceite de parafina

estéril para favorecer la anaerobiosis. Las placas se incubaron a 37°C y fueron leídas a las 24 y 48 h para verificar los resultados. Las pruebas se interpretaron como positivas, negativas o variables dependiendo del cambio de color en el medio contenido en los microtubos. Los registros obtenidos fueron interpretados mediante el software APILab Plus (bioMérieux, Inc)

6.2.2. Identificación de los microorganismos aislados mediante extracción de ADN y PCR

6.2.2.1. Extracción de ADN

Los microorganismos fueron cultivados en caldo MRS durante 24 h a 37°C. Para la extracción de ADN se utilizó el kit de Wizard Genomic DNA Purification (Promega) siguiendo la metodología específica para bacterias Gram-positivas. Una alícuota de 1 mL de cada uno de los caldos fue centrifugado por 2 min a 16,000 rpm. El sedimento fue suspendido en 480 µL de EDTA 50 mM y 120 µL de enzimas líticas (Lisozima, 10 mg/mL). La mezcla se incubó a 37°C por 30 min, se centrifugó por 2 min a 16000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 600 µL de solución lítica y se incubó por 5 min a 80°C, enfriándose posteriormente a temperatura ambiente. Se agregaron 3 µL de solución de RNasa y se incubó a 37°C por 1 h. Con la muestra a temperatura ambiente, se precipitaron las proteínas (solución precipitadora, incubación en hielo por 5 min, centrifugación a 16,000 rpm por 3 min). El sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 600 µL de isopropanol, se centrifugó por 2 min a 16,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 600 µL de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente, se decantó el sobrenadante y se evaporó el etanol restante (10-15 min). Finalmente, se rehidrató el ADN obtenido. Después de haber extraído el ADN de las cepas aisladas se confirmó la presencia de este por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en una corrida de 1 h con un voltaje de 90 V. Después de la electroforesis el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio durante 15 min, y se visualizó irradiando con luz UV para lo cual se empleó un equipo de fotodocumentación GelDoc 2000 (Bio-Rad).

Tabla 6.1. Volumen de los componentes para la muestra en electroforesis

Muestra de ADN	5 µL
Tampón de carga Xileno-Cianol FF	2 µL
H ₂ O Bidestilada estéril	13 µL
DNA Ladder 1 kb	5 µL

6.2.2.2. PCR

La amplificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers específicos para bacterias (Klocke y Mundt, 2004). La PCR involucra la preparación de la muestra de acuerdo con la tabla 6.2:

Tabla 6.2. Mezcla de reacción para la amplificación de ADN

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
ADN molde (muestra)	-----	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1
H ₂ O bidestilada estéril	-----	-----	29.5
Tampón PCR 10X	5X	1X	10
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	5
dNTP MIX	10 mM	200mM	1
PRIMER 9F	20 μM	1 μM	1.5
PRIMER 939R	20 μM	1 μM	1.5
Taq Polimerasa	5u/ μL	2.5u/ μL	0.5
Volumen final			50

La mezcla de reacción se preparó en tubos eppendorf para microcentrífuga de 250 μL , posteriormente la amplificación se llevó a cabo en un termociclador Corbett Research con el siguiente programa de acuerdo con el método modificado de Klocke y Mundt (2004).

Tabla 6.3. Condiciones para la amplificación de ADN mediante PCR

Operación	Condiciones
Precalentamiento	94°C por 2 min
Desnaturalización	94°C por 1 min
Hibridación	65°C por 1 min
Amplificación	72°C por 1 min
Extensión	72°C por 5 min
Ciclos	30

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v estimando el tamaño de los fragmentos por comparación con el marcador estándar de 1 kb.

6.2.2.3. Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron por medio del sistema comercial Wizard™ SV Gel and Clean-Up System (Promega, USA). Se agregó un volumen igual de solución ligadora de membrana a los productos de PCR, ésta mezcla se depositó en una minicolumna SV que se encontraba dentro de un tubo de colecta. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 16,000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante del tubo de colecta y se insertó nuevamente la minicolumna dentro del tubo de colecta. La columna se lavó con 700 µL de solución de lavado de membrana previamente diluida con etanol al 95% v/v. Después se centrifugó a 16,000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante del tubo de colecta. Se repitió el paso anterior con 500 µL de solución de lavado de membrana y se centrifugó durante 5 min a 16,000 rpm. Se vació el tubo de colecta y se dejó evaporar el etanol residual a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente, se transfirió la minicolumna a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL y se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas a la minicolumna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Finalmente, se centrifugó a 16,000 rpm por 1 min, y refrigeró el tubo eppendorf con el producto purificado.

6.2.2.4. Secuenciación del ADN

La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Para la secuenciación se utilizó el método de terminación de cadena de Sanger, utilizando dideoxinucleótidos (ddNTP'S) en combinación con los nucleótidos presentes y ADN polimerasa para formar fragmentos de diferentes longitudes durante la elongación normal del ADN. El secuenciador lleva a cabo una separación (por electroforesis capilar) del ADN basada en el tamaño de las cadenas obtenidas. Cada uno de los cuatro ddNTP's presentes al final de la cadena fluoresce en un color diferente cuando es iluminado por un láser que como respuesta provee de una secuencia de bases impresa.

Para identificar los microorganismos aislados se realizó la comparación de las regiones amplificadas con las ya registradas en la base de datos BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

6.3. Asimilación de prebióticos

6.3.1. Consumo de prebióticos

El consumo de las distintas fuentes de carbono utilizadas se determinó mediante HPLC. Se utilizó una columna de monosacáridos 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 muestras (1 mL) se tomaron cada 4 h durante 32 h y se centrifugaron a 14000 rpm (20,000 x *g*) y 4 °C por 10 minutos para eliminar las células. Posteriormente fueron filtradas a través de una membrana de 0.22 µm para eliminar cualquier otro contaminante y ser analizadas. Las concentraciones de los azúcares encontrados se calcularon mediante el uso de curvas patrón realizadas para cada uno de ellos.

6.3.2. Crecimiento microbiano

Se realizaron fermentaciones en botellas serológicas de 100 mL con 50 mL de medio de cultivo que contenía: fuente de carbono (1% p/v), extracto de levadura (0.3% p/v) y peptona de caseína (0.5% p/v). Se mantuvo una temperatura constante de 37°C y una agitación de 50 rpm. Se evaluaron 3 carbohidratos prebióticos (lactulosa, inulina y Oligomate 55) y un carbohidrato control (lactosa). El crecimiento de los microorganismos en log base 10 de las unidades formadoras de colonias (ufc)/mL se determinó cada 4 h durante 32 h mediante la siembra en placa con agar MRS, utilizando la técnica de Weng *et al.* (2004).

6.3.3. Actividad prebiótica

Se realizaron fermentaciones con una duración de 32 h utilizando el medio de cultivo mencionado anteriormente y las distintas fuentes de carbono evaluadas. Se cultivaron por separado cada una de las cepas probióticas y una bacteria entérica (*Escherichia coli* K12). Como medio control se utilizó lactosa. El índice prebiótico se calculó de acuerdo a la ecuación 6.1 (Palframan *et al.*, 2003). La actividad prebiótica se determinó usando la siguiente ecuación 6.2 (Huebner *et al.*, 2007):

$$I_{preb} = \frac{(ufc \text{ probióticos})_{generada \text{ en el prebiótico}}}{(ufc \text{ probióticos})_{generada \text{ en lactosa}}} \quad \text{Ec. 6.1}$$

$$A_{preb} = \frac{(ufc \text{ probióticos})_{generada \text{ en el prebiótico}}}{(ufc \text{ probióticos})_{generada \text{ en lactosa}}} - \frac{(ufc \text{ entéricos})_{generada \text{ en el prebiótico}}}{(ufc \text{ entéricos})_{generada \text{ en lactosa}}} \quad \text{Ec. 6.2}$$

Las poblaciones microbianas se cuantificaron mediante la siembra en placa con agar MRS para las cepas probióticas y agar EMB para *E. coli* K12, utilizando la técnica de Miles y Misra. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h.

6.3.4. Rendimiento prebiótico

Para determinar la relación entre sustrato consumido y la biomasa obtenida, se definió el rendimiento biomasa-sustrato (Y_{preb}) de acuerdo a la ecuación 6.3 (Pirt, 1975).

$$Y_{preb} = \frac{ufc_{i32} - ufc_{i0}}{mg \text{ preb}_{i0} - mg \text{ preb}_{i32}} \quad \text{Ec. 6.3}$$

6.4. Producción de compuestos antimicrobianos

6.4.1 Producción de ácidos grasos de cadena corta

Para la determinación de ácidos grasos de cadena corta se analizó el sobrenadante libre de células obtenido al final de las fermentaciones (32 h) realizadas con las distintas fuentes de carbono mediante HPLC con la técnica modificada de Desai *et al.* (2004), utilizando una columna ROA-ácidos orgánicos (300 x 7.8 mm Phenomenex-Rezek) a un flujo de 0.5 mL de H₂SO₄ 0.005 N/min y 25°C. La concentración de AGCC se obtuvo mediante el uso de curvas patrón elaboradas con estándares de ácido láctico, acético, propiónico y butírico.

6.4.2. Producción de peróxido de hidrógeno

La generación de peróxido de hidrógeno se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Batdorj *et al.* (2007) con pequeñas modificaciones. Las muestras obtenidas al final de las fermentaciones fueron centrifugadas a 14,000 rpm (20,000 x g) y 4°C durante 10 min. Posteriormente, a 1mL de cada una de las muestras a analizar se le añadió 1mL de buffer de fosfatos (pH 7) con 4-

hidroxibenzoato (12 mM) que contenía 1kU/L de peroxidasa de rábano (Wienerlab, Argentina). Se llevó a cabo la reacción colorimétrica durante 10 min a 37°C y la cuantificación de H₂O₂ se llevó a cabo utilizando una curva patrón elaborada con concentraciones de 10-200 µg/mL, midiendo la absorbancia a 505 nm.

6.4.3. Producción de bacteriocinas

Para determinar la presencia de bacteriocinas en los distintos medios de cultivo al final de las fermentaciones se utilizó la técnica modificada de Papagianni *et al.* (2006). Se utilizaron como microorganismos indicadores cultivos de *Escherichia coli* K12, *Micrococcus luteus* CD-B-BB1018 y *Listeria innocua* ATCC 33090 para determinar la presencia de bacteriocinas; estos microorganismos se cultivaron por separado en caldo nutritivo (*E. coli*), caldo cerebrocorazón (*M. luteus*) y caldo nutritivo adicionado con 2.5 g/L de glucosa, 5 g/l de NaCl y 15 g/L de peptona de caseína (*L. innocua*) durante 24 h a 37°C. Posteriormente 50 mL de cada uno de los cultivos se transfirió a un matraz que contenía 200 mL de medio fresco y se incubaron por 3 h a 37°C y con una agitación de 150 rpm para obtener células en fase de crecimiento logarítmica. Los tubos contenían 0.5 mL de los caldos de cultivo a analizar o bien caldo de cultivo estéril (control) y 2 mL de caldo de cultivo con el microorganismo indicador con una absorbancia inicial de 0.120. Se midió la absorbancia a 650 nm de todos los tubos después de 3 h de incubación (37°C) El porcentaje de células inhibidas se determinó mediante la Ecuación 6.4:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{D.Op}{D.Oc} \times 100 \quad \text{Ec. 6.4}$$

en donde:

D.Op = Densidad óptica de prueba a las 3 h

D.O.c = Densidad óptica del control

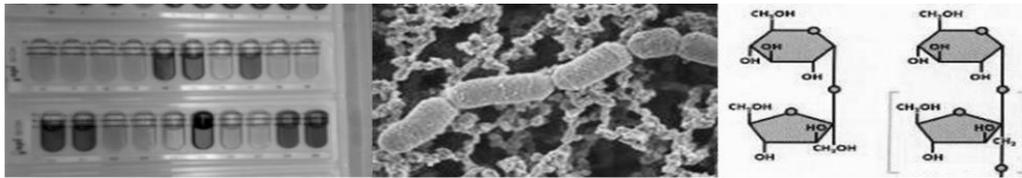
Para determinar la presencia de bacteriocinas en los diferentes medios de cultivo fue necesario realizar tres distintos tratamientos (Tabla 6.4) con la finalidad de eliminar de manera secuencial los distintos compuestos inhibidores presentes. Las muestras fueron evaluadas después de cada tratamiento con la técnica mencionada anteriormente (Papagianni *et al.*, 2006).

Tabla 6.4. Tratamientos para la identificación de las sustancias antimicrobianas

	Tratamiento
Neutralización de AGCC (Sezer y Güven, 2009)	Ajuste del valor de pH de los medios analizados a 7.0 utilizando NaCl 2 M.
Eliminación de H ₂ O ₂ (Sezer y Güven, 2009)	Adición de catalasa (0.1 mg/mL), incubación (25°C/90 min), inactivación de la enzima (60°C/10 min)
Eliminación de sustancias protéicas (bacteriocinas) (Mobarez <i>et al.</i> , 2008)	Adición de proteinasa K (0.1 mg/mL), incubación 37°C/120 min), inactivación de la enzima (60°C/10 min)

6.5. Análisis estadístico

Para determinar si existieron diferencias significativas en los efectos obtenidos con los diferentes prebióticos utilizados se realizaron pruebas de ANOVA ($\alpha=0.05$) con el programa estadístico NCSS 2000 (Hintze, 2000).



7. Resultados y discusión

7.1. Aislamiento de cepas probióticas

7.2. Identificación de microorganismos aislados de productos comerciales

7.3. Asimilación de prebióticos

7.4. Producción de compuestos antimicrobianos

7.1. Aislamiento de cepas probióticas

Las condiciones de cultivo seleccionadas para el aislamiento de los microorganismos probióticos se muestran en la Tabla 7.1. Los medios utilizados se determinaron tomando como base el reporte de Tharmaraj y Shah (2003). De acuerdo con estos autores cuando el pH del agar MRS a 5.2 y se incrementa la temperatura a 42°C las cepas de *L. rhamnosus* forman colonias brillantes y lisas de aproximadamente 2 mm mientras que *L. acidophilus* y *L. johnsonii* forman colonias ligeramente cafés e irregulares. Estos mismos autores demostraron que diversas cepas de *L. casei* crecieron bien agar MRS con una concentración de NaCl de 4 g/L; e incubados a 37°C; estas mismas condiciones habían sido reportadas por Ravula y Shah (1998). De esta forma, el primer criterio para la selección de los microorganismos fue la morfología colonial (Tabla 7.2) tomando como base lo reportado por Tharmaraj y Shah (2003) y Vasiljevic y Shah (2008). Una vez seleccionadas las cepas, se realizaron resiembras de manera secuencial de las colonias aisladas y se crecieron en todos los medios modificados para determinar si se encontraban puras.

Las Figuras 7.1 y 7.2 muestran las imágenes de las cajas Petri con las colonias obtenidas del aislamiento de los microorganismos de los distintos productos comerciales, así como las condiciones de aislamiento y las imágenes de tinción de Gram tomadas al microscopio.

Tabla 7.1. Condiciones para el aislamiento de bacterias probióticas.

Producto comercial	Condiciones de aislamiento	Microorganismo reportado por el productor (etiqueta)
Culturelle	MRS-pH 5.2, 42°C	<i>L. GG</i>
NAN	MRS-pH 5.2, 42°C	<i>L. rhamnosus</i>
Chamyto	MRS-pH 5.2, 42°C	<i>L. johnsonii</i>
Yakult	MRS-NaCl, 37°C	<i>L. casei</i> Shirota
Bio 4	MRS-NaCl, 37°C	<i>L. vitakasei</i>
Kul-tai	MRS-NaCl, 37°C	<i>L. bulgaricus</i>

Tabla 7.2. Morfología colonial de los microorganismos aislados de los productos comerciales.

Producto	Morfología en medio MRS modificado
Culturelle	Colonias lisas, blancas y brillantes de 2 mm de diámetro
NAN	Colonias rugosas e irregulares, cafés y de 0.1 a 0.5 mm de diámetro
Chamyto	Colonias rugosas, ligeramente cafés
Yakult	Colonias lisas, brillantes y blancas de 0.1 a 0.5 mm de diámetro
Bio 4	Colonias lisas, brillantes y blancas de 0.5 a 1 mm de diámetro
Kul-tai	Colonias lisas, brillantes y blancas de 0.1 a 0.5 mm de diámetro

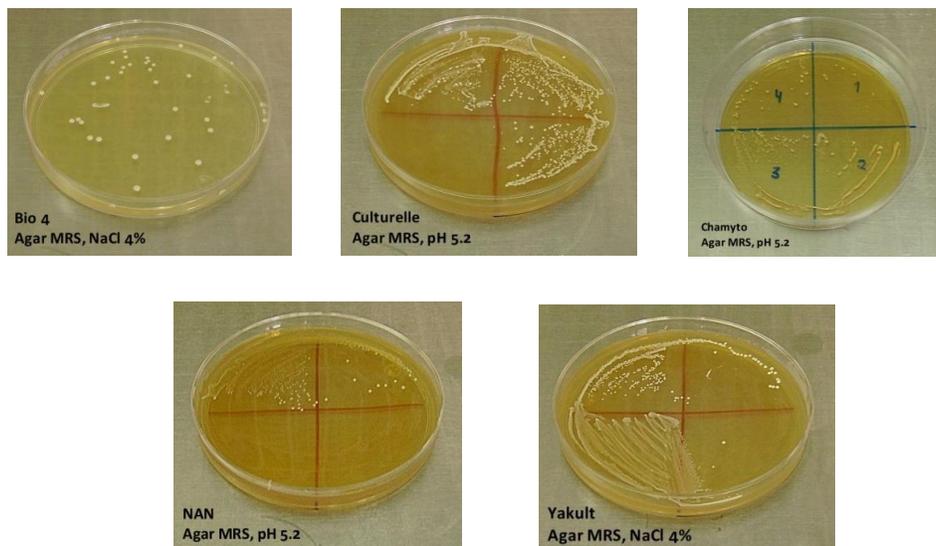


Figura 7.1. Microorganismos probióticos aislados a partir de productos comerciales.

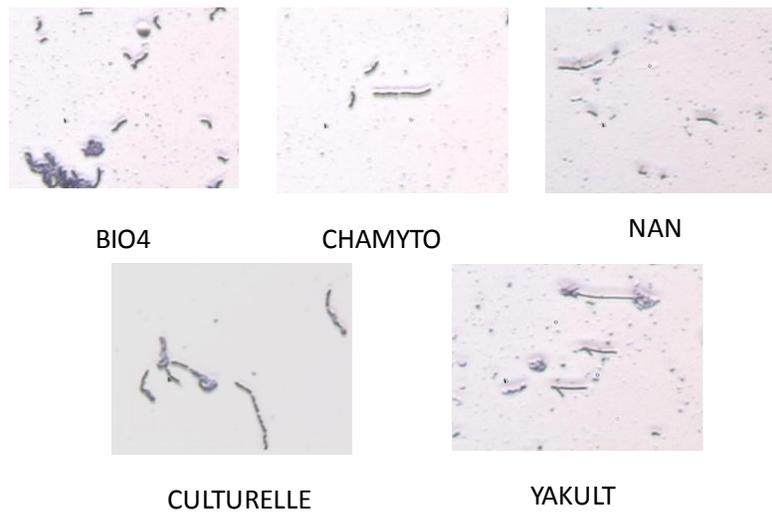


Figura 7.2. Imágenes al microscopio de los microorganismos probióticos aislados.

7.2. Identificación de los microorganismos aislados de productos comerciales

Para comprobar la identidad de los microorganismos aislados se realizó la identificación de los mismos mediante API CHL, sin embargo, esta no fue satisfactoria ya que todos los microorganismos fueron identificadas como *L. paracasei* y únicamente se logró confirmar que todas las cepas aisladas pertenecían al género *Lactobacillus*. De acuerdo con Desai *et al.* (2006) los grupos de especies estrechamente relacionados como *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* han sido difíciles de distinguir unos de otros mediante pruebas fenotípicas. Por lo mismo se descartó el uso de pruebas bioquímicas debido a que la identificación de lactobacilos utilizando métodos bioquímicos es notoriamente difícil ya que se requieren pruebas de fermentación poco comunes y porque el gran número de especies existentes complica la identificación (Baele *et al.*, 2002).

Es ampliamente reconocido que la taxonomía del género *Lactobacillus* no es satisfactoria debido a la naturaleza altamente heterogénea de sus miembros y a pesar del incremento significativo en el número de especies de *Lactobacillus* reconocidas, no se ha publicado alguna filogenia completa desde 2005 (Canchaya *et al.*, 2006). Dado que no fue posible identificar a las bacterias aisladas a nivel de especie se decidió realizar la extracción de ADN total y la amplificación mediante PCR de la región 16S por dos razones: i) Diversos estudios de homología de ADN resultaron en el reconocimiento de 3 especies (*L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*) en lugar de un solo taxón denominado "*L. casei*" (Desai *et al.*, 2006) y ii) El análisis genómico comparativo de 16Sr RNA es el marcador más establecido (Cahchaya *et al.*, 2006).

Una vez que se extrajo el ADN de las células se realizó la reacción de amplificación (PCR) y se verificó que se hubiera obtenido una cadena de alrededor de 1000 pares de bases (Figura 7.3). Una vez obtenido el ADN y realizada la amplificación del mismo, se comprobó la pureza de los fragmentos obtenidos utilizando un gel de agarosa en el que no se observó la presencia de bandas adicionales a las de 1000 pares de bases (Figura 7.4). Una vez obtenidos y nuevamente purificados, los productos de PCR fueron secuenciados y comparados con la base de datos BLAST e identificados.

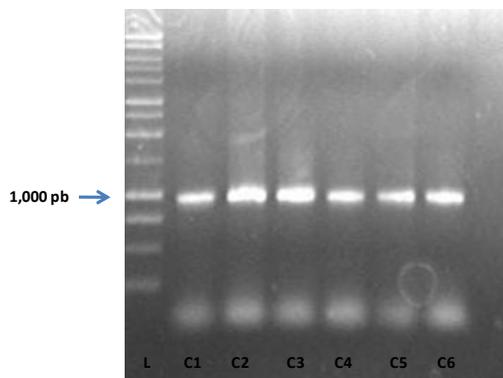


Figura 7.3. Extracción de ADN (1000 pares de bases) de los microorganismos aislados de productos comerciales. L: marcador 1 kb; C1: Bio 4; C2: Chamyto; C3: Culturelle; C4: Kul-tai; C5: NAN; C6: Yakult.

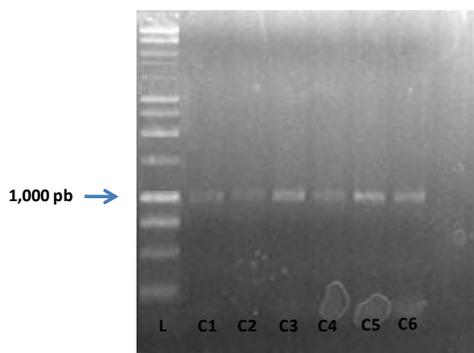


Figura 7.4. Determinación del tamaño de los productos de PCR para los microorganismos aislados de productos comerciales. L: marcador 1 kb; C1: Bio 4; C2: Chamyto; C3: Culturelle; C4: Kul-tai; C5: NAN; C6: Yakult.

7.2.1. Secuencias analizadas para identificación

Cepa aislada de Bio4 (C1)

```
CGAACGAGTGTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
CTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTAT
CGCTTTTGGATGGACCCGCGGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGG
CCACATTTGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGAAGAAGGCTTTCCGGTCTGTAATACTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTGTCGGCGTGACGGTATCCAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG
CGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAA
CTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTCTGAGGCTCGAA
AGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCCG
CAGCTAACGCATTAGAGCTATTCCGCCGTGGGA
```

Cepa aislada de Chamyto (C2)

```
CAAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGC
TATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGAT
```

CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTTCGGCGGTGACGGTATCCA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA
GGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG
AACTCCATGTGT

Cepa aislada de cápsulas Culturelle (C3)

TGAAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
TTAAGTGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATC
GCTTTTGGATGGACCCGCGGCTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGTTGATCGGC
CACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
GTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG
GGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAC
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTCGAAA
GCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTCCGC

Cepa aislada de Kul-tai (C4)

GAACGAGTTCTCGGTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTT
AAGTGGGGATAACATTTGAAACCGATGCTAATACCGGTAGATCCAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGC
TGTTGGATGGACGCGCGGCTATTATCTAGTTGGTGGGTAGTGGCTCACCGAGGCGATGATACGTTGCCGAACTGAGAGTTGATCGGCCA
CATTTGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCT
GAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG
TTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG

Cepa aislada de Leche NAN (Nestlé) (C5)

AACGAGTGTCTGAGTTATGTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCCTTAAGTGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGGTAAATCCAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGC
TATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGTTGAT
CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTTCGGCGTGACGGTATCC
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
AGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG
GAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTC
GAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT

Cepa aislada de Yakult (C6)

CGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT
TAAGTGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCG
CTTTTGGATGGACCCGCGGCTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGTTGATCGGCC
ACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG

TGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGCCGGCGTGACGGTATCCAACCA
 GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCG
 GTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACT
 CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGCGCGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAG
 CATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCA
 GCTAACGCATTAGAGCTATGCCCCCGG

La Tabla 7.3 muestra la comparación de los resultados obtenidos mediante API 50 CH y la extracción de ADN, así como la identificación de los microorganismos probióticos aislados de los distintos productos comerciales. De igual forma se enlistan las claves de acceso para las secuencias proporcionadas por The GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/upload.html). Cabe mencionar que en ninguno de los casos la identificación mediante API 50 CH y la identificación por análisis genómico presentaron coincidencias. Esto puede deberse a que las pruebas API son en extremo variables y pocas veces concuerdan con los análisis de ADN. Boyd *et al.* (2005) evaluaron el uso de API 50 CH para la identificación de diversas especies de *Lactobacillus*. Los 97 perfiles de las cepas de lactobacilos demostraron diversidad fenotípica. Ninguna de los 18 *L. crispatus* aisladas compartieron patrón y las cepas de *L. gasseri* ofrecieron 18 diferentes patrones de 20 analizados. Los mismos autores comprobaron que el sistema API 50 CH identificó erróneamente 33 de las 97 cepas aisladas. En un estudio realizado por Annuk *et al.* (2003) un tercio de las cepas de *Lactobacillus* analizadas tuvieron diferencias entre su identificación preliminar con API y su identificación con técnicas moleculares.

Tabla 7.3. Comparación entre identificación por API 50 CHL y por extracción de ADN y PCR.

Producto y microorganismo buscado	Identificación API 50 CH	% de identidad	Identificación por extracción de ADN total y PCR			
			Longitud de secuencia (pb)	Secuencias identificadas	Clave de acceso para secuencia	% de identidad
Leche fermentada (110g) BIO 4 LALA, México <i>Lactobacillus vitakasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	90	858	<i>Lactobacillus casei</i> IMAU60214	GUSS0098	99
Leche fermentada (76 mL) CHAMYTO NESTLÉ, México <i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	87	654	<i>Lactobacillus helveticus</i> IMAU70129	GUSS0099	99
Cápsulas CULTURELLE, USA <i>Lactobacillus GG</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	88	851	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	GUSS0100	99
Leche fermentada (80 mL) KUL-TAI DEL VALLE, México <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	85	703	<i>Lactobacillus casei</i> MB65	GUSS0101	98
Leche en polvo (400g) NAN 1, NESTLÉ, México <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	88	863	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KLDS	GUSS0102	98
Leche fermentada (80 mL) YAKULT, México <i>Lactobacillus casei</i> Shirota	<i>Lactobacillus paracasei</i>	90	851	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	GUSS0103	99

7.3. Asimilación de prebióticos

7.3.1. Consumo de prebióticos

La Figura 7.5 muestra el consumo de los diferentes carbohidratos evaluados. Se observa claramente los prebióticos son consumidos de manera relativamente constante durante 32 h lo que indicaría un aumento en debería verse reflejado en el aumento, mantenimiento y viabilidad de los microorganismos probióticos, criterios que ha sido de interés tanto comercial como tecnológico para varios productores industriales (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). Diversos estudios *in vitro* han mostrado que el consumo de prebióticos promueve el crecimiento de bacterias probióticas por más de 24 h. Rycroft *et al.* (2001) reportaron que los XOS y los GOS produjeron grandes poblaciones de lactobacilos. Pan *et al* (2009) determinaron el establecimiento de una fase estacionaria a las 14 h de fermentación que se prolongó más allá de las 26 h cuando utilizaron FOS y XOS.

7.3.2. Crecimiento microbiano

Para determinar el efecto prebiótico de diversos carbohidratos, los seis microorganismos aislados de productos comerciales fueron evaluados para comparar su crecimiento en medios de cultivo suplementados con lactulosa, inulina u Oligomate 55. Además se utilizó lactosa como azúcar no prebiótico y control. La Figura 7.6 muestra el crecimiento de cada uno de los probióticos durante las 32 h de fermentación. Al analizar en conjunto las Figuras 7.5 y 7.6 se confirma que los microorganismos probióticos crecen y se mantienen a partir del consumo de los diferentes carbohidratos evaluados durante las 32 h de fermentación y hasta las 48 h (datos no mostrados).

La Figura 7.7 muestra únicamente el crecimiento obtenido después de 32 h de fermentación. De acuerdo al análisis estadístico, el crecimiento de *L. casei* Shirota y *L. casei* IMAU60214 fue significativamente mayor que para el resto de los microorganismos en lactulosa, mientras que en inulina, los que presentaron un mayor crecimiento fueron *L. casei* IMAU60214 y *L. helveticus* IMAU70129, seguidos de *L. casei* Shirota. De igual forma, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS y *L. casei* MB65 se agrupan según el análisis estadístico, con un crecimiento más bajo y sin diferencias significativas entre sus poblaciones pero diferenciándose del resto.

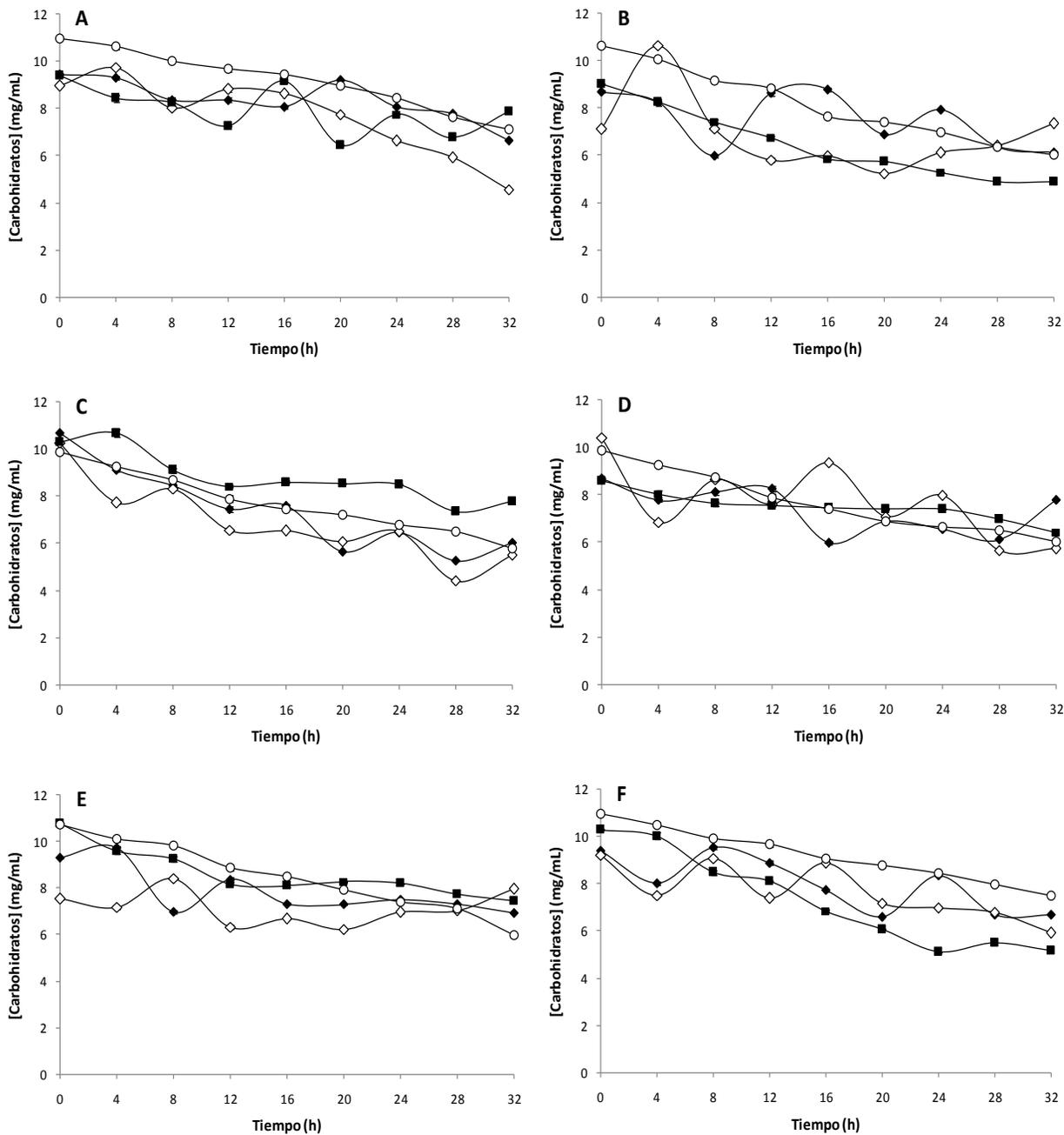


Figura 7.5. Consumo de carbohidratos por bacterias probióticas aisladas de productos comerciales. A: *L. casei* IMAU60214; B: *L. casei* MB65; C: *L. casei* Shirota; D: *L. helveticus* IMAU70129; E: *L. rhamnosus* GG; F: *L. rhamnosus* KLDS. (◆) Lactosa; (◇) Lactulosa; (■) Inulina; (○) Oligomate 55.

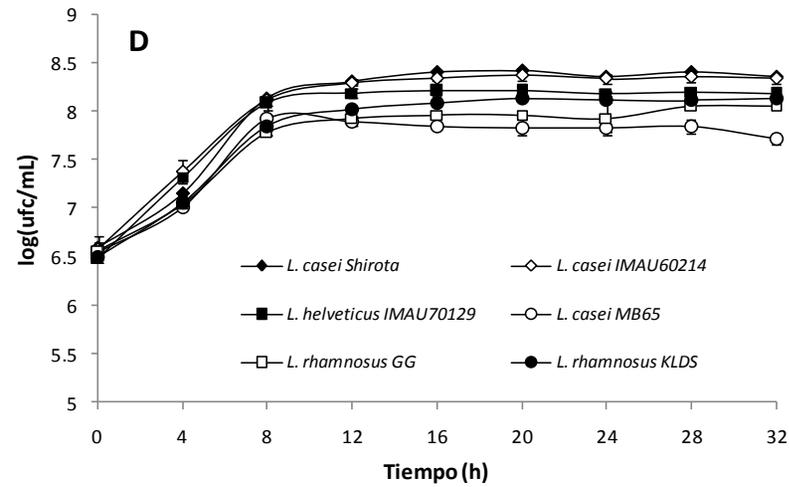
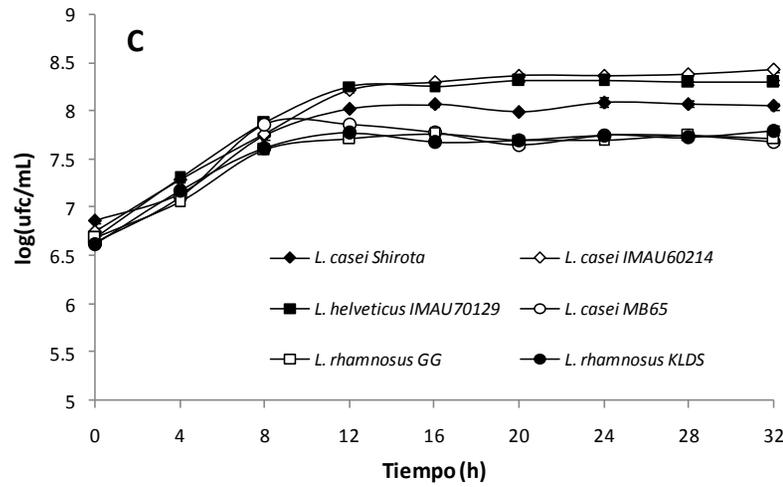
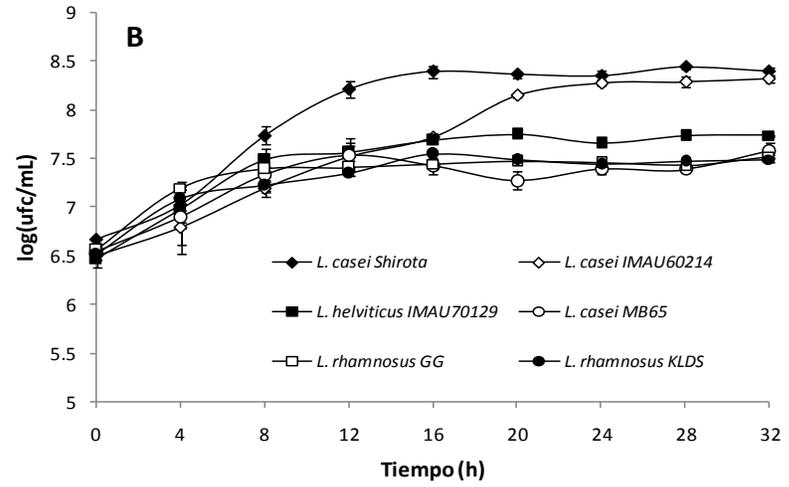
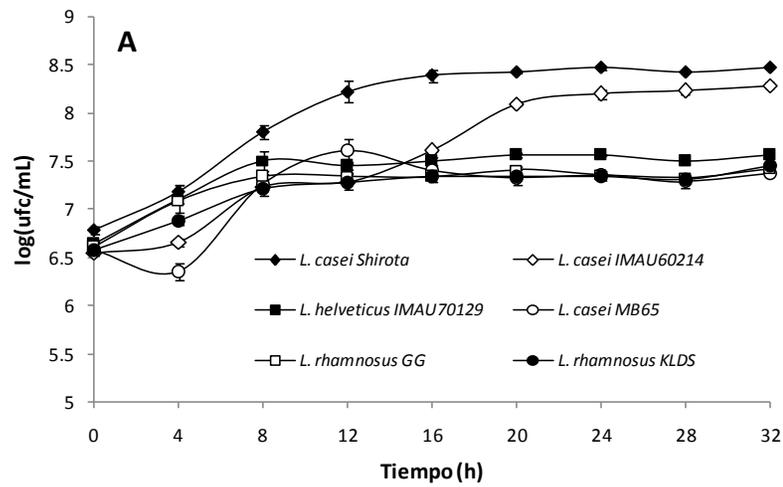


Figura 7.6. Crecimiento de microorganismos probióticos en diversos medios de cultivo. (A) lactosa; (B) lactulosa; (C) inulina y (D) Oligomate 55.

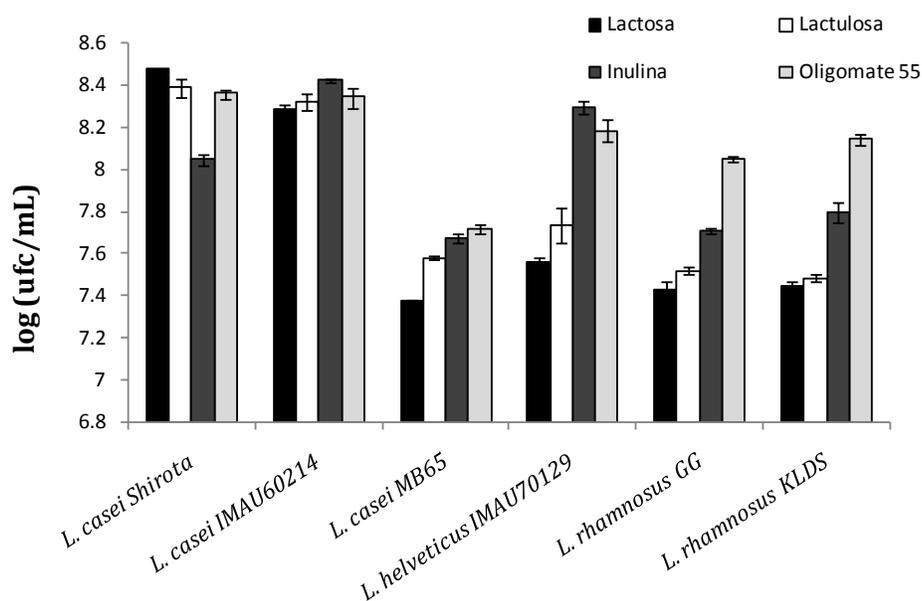


Figura 7.7. Crecimiento probiótico a las 32 h en diversos carbohidratos.

De acuerdo con Huebner *et al.* (2007), diversos estudios han mostrado que la habilidad de los lactobacilos para fermentar carbohidratos prebióticos es específica para la cepa y el sustrato. Makras *et al.* (2005) demostraron que los microorganismos probióticos producen β -fructosidasas para degradar inulina y β -galactosidasa para degradar GOS y TOS; se sabe que la inulina tiene principalmente un efecto bifidogénico, sin embargo se ha demostrado que ciertas cepas de lactobacilos (*L. acidophilus* y *L. casei*) son capaces de crecer en este sustrato. Estos mismos autores reportaron que *L. casei* Shirota no crece bien en inulina, pero si lactulosa, y TOS; mientras que *L. rhamnosus* no crece bien en inulina y lactulosa, presentando un mejor crecimiento en TOS. Estos resultados concuerdan con lo presentado en la Figura 7.7 ya que la menor población de *L. casei* Shirota fue en inulina mientras que las dos cepas de *L. rhamnosus* crecieron mejor en Oligomate 55 que en lactulosa e inulina. En el caso de *L. casei* IMAU60214 y *L. casei* MB65 no se presentaron los efectos mencionados

7.3.3. Actividad prebiótica

La figura 7.8 muestra el consumo de carbohidratos realizado por los microorganismos probióticos; al igual que con los datos obtenidos para crecimiento, el consumo de las fuentes de carbono fue variable. El máximo consumo fue 50% de inulina por *L. rhamnosus* KLDS y el

mínimo de alrededor de 25% de Oligomate 55 por este mismo microorganismo, estos datos indican que los carbohidratos evaluados sí son metabolizados por los microorganismos probióticos. Si bien, el efecto del prebiótico suministrado para el crecimiento de los microorganismos probióticos es variable, la estimulación del crecimiento probiótico es de gran importancia para la evaluación de carbohidratos prebióticos (Roberfroid, 2007).

La fermentación de los oligosacáridos está fuertemente influenciada por sus estructuras químicas y la identidad de las unidades monoméricas, su grado de polimerización y el tipo de unión entre los monómeros y la complejidad de la molécula (Swennen *et al.*, 2006). Un buen sustrato prebiótico refleja su habilidad para mantener el crecimiento de un microorganismo en relación con otro y además en relación al crecimiento en un sustrato no prebiótico. Por lo tanto, los carbohidratos tienen un efecto prebiótico positivo si son (i) metabolizados por los microorganismos tan bien como el sustrato no prebiótico y (ii) son selectivamente metabolizados por los probióticos, pero no por otras bacterias intestinales (Huebner *et al.*, 2007).

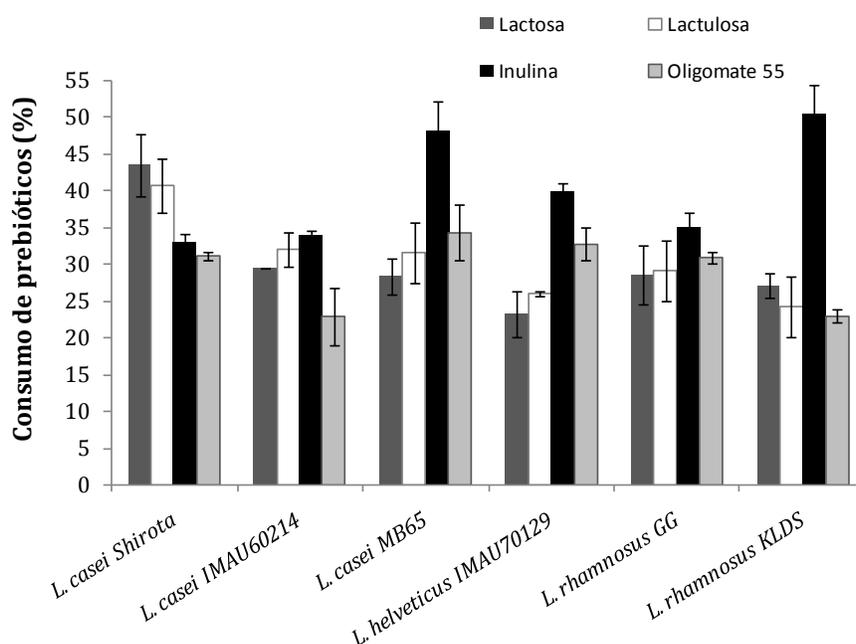


Figura 7.8. Consumo de carbohidratos prebióticos después de 32 h

7.3.4. Rendimiento prebiótico

El rendimiento prebiótico es importante para expresar de manera cuantitativa los requerimientos nutrimentales de un microorganismo (Pirt, 1975). Al relacionar la concentración de biomasa obtenida con el consumo de una fuente de carbono que en este caso son carbohidratos prebióticos se puede determinar si se obtuvo un efecto de estimulación de los prebióticos evaluados sobre el crecimiento de los microorganismos probióticos en comparación con el carbohidrato control.

Los datos presentados en la Tabla 7.4 indican que los prebióticos utilizados son capaces de mantener acelerar el crecimiento de las bacterias probióticas; sin embargo, no en todos los casos se observó un aumento en el número de ufc generadas por cada gramo de sustrato consumido con respecto al control. El análisis estadístico determinó que si existió un incremento significativo en el número de unidades formadoras de colonias con respecto al control en los casos de *L. helveticus* IMAU70129 en inulina, *L. rhamnosus* GG en Oligomate 55 y *L. rhamnosus* KLDS en Oligomate 55. En un experimento para determinar la sobrevivencia de lactobacilos en medios con prebióticos, Desai *et al.* (2004) utilizaron el tiempo de duplicación como una medida de la efectividad de los oligosacáridos para modular la tasa de crecimiento y en general, el tiempo de duplicación de las cepas de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*) disminuyó cuando crecieron en prebióticos, en comparación con el control, lo que al igual que en el presente trabajo indicó un efecto benéfico sobre el crecimiento de las cepas probióticas.

Las Tablas 7.5 y 7.6 presentan los datos de tasas de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) calculados a partir de los datos de la fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada una de las bacterias evaluadas. De acuerdo con estos resultados la μ en los medios con prebióticos fue significativamente mayor con respecto al control.

En consecuencia, los t_d fueron significativamente menores con los carbohidratos prebióticos con excepción de *L. casei* Shirota en inulina, *L. helveticus* IMAU70129 en lactulosa y *L. rhamnosus* KLDS en inulina. Desai *et al.* (2004) reportaron que tanto en inulina como en lactulosa los t_d de *L. casei* y *L. rhamnosus* disminuyeron, caso contrario a los resultados obtenidos en este trabajo. En la literatura ha sido reportado ampliamente que el crecimiento

de un microorganismo en un oligosacárido en particular puede ser específico para cada cepa y dependiente de sus hidrolasas específicas y sus sistemas de transporte además de las condiciones para su crecimiento (Huebner *et al.*, 2007; Yeo y Liong, 2009 y Pan *et al.*, 2009).

Así mismo existen reportes contradictorios sobre el uso de prebióticos para estimular el crecimiento de bacterias probióticas. Huebner *et al.* (2007) reportó que *L. paracasei* 1195 creció mejor en caldo MRS con 10 g/L de FOS y 10 g/L de inulina que en el medio con glucosa, mientras que Kaplan y Hutkins reportaron que tres cepas de *Lactobacillus* fueron incapaces de fermentar FOS. Por lo anterior, es de esperarse que siempre existan diferencias entre los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad prebiótica en las diferentes combinaciones simbióticas empleadas.

Tabla 7.4. Rendimiento prebiótico.

$Y_{\text{preb}} (x/s)$ (ufc producidas $\times 10^7$/mg de sustrato consumido)				
Microorganismo	Lactosa	Lactulosa	Inulina	Oligomate 55
<i>L. casei</i> Shirota	5.38	4.10	2.76	4.65
<i>L. casei</i> IMAU60214	9.22	4.01	7.08	2.21
<i>L. casei</i> MB65	0.71	1.64	1.02	2.03
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	1.66	1.10	10.2	3.04
<i>L. rhamnosus</i> GG	0.96	1.65	2.05	3.10
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	0.83	0.82	1.03	8.74

* Los resultados son el promedio de 4 fermentaciones. El error estándar fue siempre menor al 10% en todos los datos.

Tabla 7.5. Tasas de crecimiento.

μ (h^{-1})				
Microorganismo	Lactosa	Lactulosa	Inulina	Oligomate 55
<i>L. casei</i> Shirota	0.285	0.308	0.234	0.351
<i>L. casei</i> IMAU60214	0.161	0.197	0.279	0.34
<i>L. casei</i> MB65	0.199	0.194	0.254	0.287
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	0.285	0.218	0.304	0.338
<i>L. rhamnosus</i> GG	0.212	0.24	0.208	0.278
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	0.141	0.166	0.224	0.308

* Los resultados son el promedio de 4 fermentaciones. El error estándar fue siempre menor al 10% en todos los datos.

Tabla 7.6. Tiempo de duplicación.

t_d (min)				
Microorganismo	Lactosa	Lactulosa	Inulina	Oligomate 55
<i>L. casei</i> Shirota	145.93	135.03	177.73	118.49
<i>L. casei</i> IMAU60214	258.32	211.11	149.06	122.32
<i>L. casei</i> MB65	208.99	214.38	163.74	144.91
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	145.93	190.77	136.81	123.04
<i>L. rhamnosus</i> GG	196.17	173.29	199.95	149.60
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	294.96	250.54	185.66	135.03

* Los resultados son el promedio de 4 fermentaciones. El error estándar fue siempre menor al 10% en todos los datos.

Hasta este momento, se ha mostrado aunque los resultados obtenidos durante el desarrollo de los experimentos han sido variables, proporcionan información que si bien refleja la habilidad del prebiótico, en conjunto no son datos totalmente útiles al momento de identificar la combinación ideal de prebióticos y probióticos. Generalmente, los efectos prebióticos descritos en la literatura no están reportados como un valor cuantitativo, cualquier candidato prebiótico es comparado de manera cualitativa mediante la comparación de su efecto en las poblaciones o grupos bacterianos como bifidobacterias, lactobacilli, clostridia y bacteroides. Existen por lo tanto dificultades en la comparación directa de diferentes prebióticos.

Para poder realizar una evaluación cuantitativa se utiliza el índice prebiótico para la determinación de los efectos prebióticos *in vitro*. Tal descripción cuantitativa de la actividad prebiótica facilita la interpretación de los resultados, proporcionando un medio para comparar diferentes carbohidratos (Palframan *et al.*, 2003). La Tabla 7.9 muestra el índice prebiótico calculado para los microorganismos y fuentes de carbono evaluadas; de acuerdo con Palframan *et al.* (2003) si el índice prebiótico es >1 se estará expresando un incremento en la población asociado al efecto prebiótico. Con excepción de *L. casei* Shirota, el resto de los microorganismos registró un incremento en su población como consecuencia del consumo de los distintos prebióticos evaluados.

En relación con lo anterior, Huebner *et al.* (2007) establecieron un resultado cuantitativo denominado "actividad prebiótica" para describir la medida en la cual los prebiótico (FOS, inulina, y GOS) sostienen el crecimiento selectivo de lactobacilos y bifidobacterias. La actividad prebiótica es un ensayo basado en la especificidad de los sustratos y los microorganismos probióticos.

Como ya se había mencionado, los carbohidratos prebióticos por definición, son metabolizados sólo por ciertos miembros de la microbiota intestinal. La habilidad de un prebiótico depende de ser fermentado selectivamente por microorganismos específicos y mantener su crecimiento. Sin embargo, es importante reconocer y no olvidar la posible presencia de otros microorganismos que pudieran tener también la habilidad de fermentar prebióticos. A diferencia del índice prebiótico, el término de actividad prebiótica incluye la valoración del consumo de prebióticos por microorganismos considerados no probióticos. Los valores mostrados en la Figura 7.10 reflejan la habilidad del sustrato evaluado para mantener el crecimiento de los microorganismos probióticos con respecto a un carbohidrato no prebiótico (lactosa) y de ser fermentado selectivamente (comparación con el consumo realizado por bacterias indeseables como *E. coli*).

De cumplirse estos dos parámetros, la actividad prebiótica será positiva. Mientras más elevado sea el valor de actividad prebiótica calculado, mayor será el efecto prebiótico del sustrato (Huebner *et al.*, 2007). En el caso de los prebióticos evaluados, el mejor carbohidrato fue Oligomate 55 con un índice prebiótico máximo de 6.6 y un mínimo de 0.6. Una actividad prebiótica muy baja o negativa, indica que la cepa probiótica evaluada creció menos en el prebiótico comparado con el azúcar control y/o que tuvo menos crecimiento en el prebiótico que las bacterias indeseables y no probióticas. Así, el efecto prebiótico más bajo para todos los microorganismos fue obtenido con lactulosa con excepción de *L. casei* Shirota cuya actividad prebiótica en inulina fue negativa. Contrario a Huebner *et al.* (2007) que reportaron la actividad prebiótica más elevada con inulina.

Cómo se esperaba, dada la conocida diversidad metabólica de los lactobacilos, existió una variación considerable en la actividad prebiótica para los diferentes prebióticos utilizados por una cepa en particular. Como ya se mencionó, la utilización de prebióticos por las bacterias ácido lácticas requiere de la presencia de hidrólisis y sistemas de transporte específicos para un prebiótico en particular, aún así, el cálculo de la actividad prebiótica proporciona una base racional para la identificación de productos simbióticos.

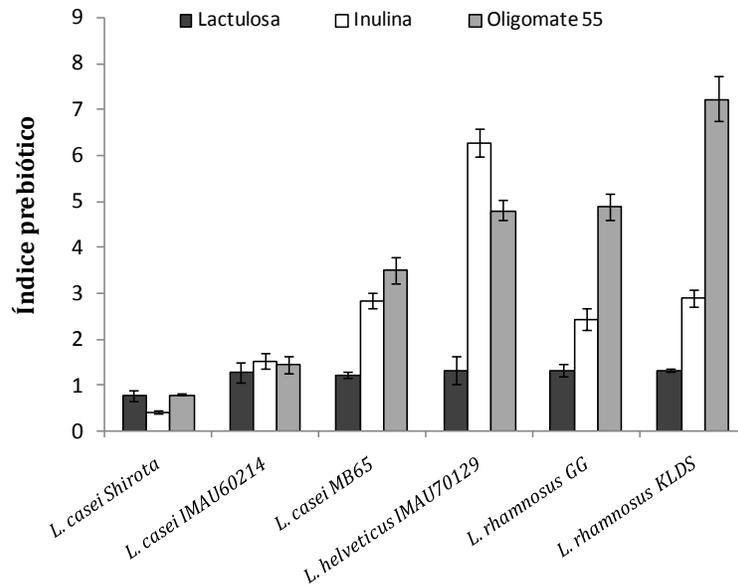


Figura 7.9. Índice prebiótico de diversos carbohidratos.

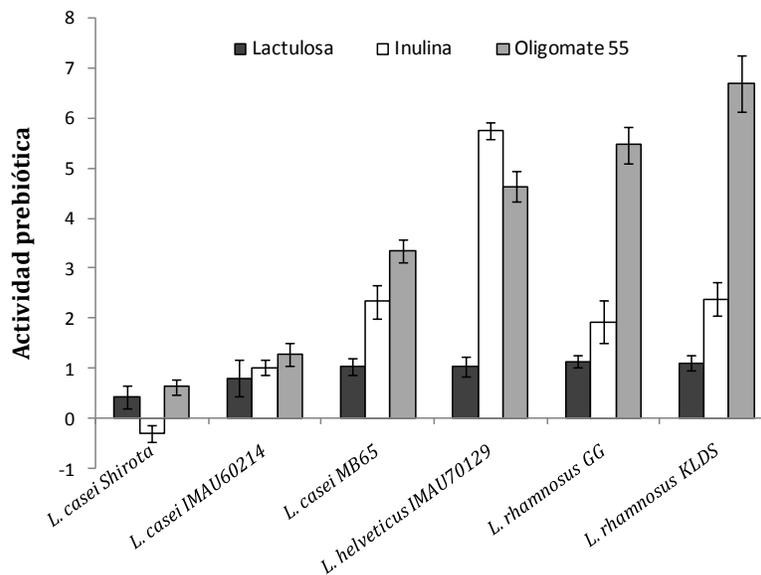


Figura 7.10. Actividad prebiótica de diversos carbohidratos.

7.4. Producción de compuestos antimicrobianos

La habilidad de las BAL para inhibir el crecimiento de diversas bacterias Gram-positivas o Gram-negativas es bien conocida. Esta inhibición puede deberse a la producción de ácidos orgánicos como el láctico y el acético, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, compuestos

semejantes a las bacteriocinas y posibles biosurfactantes, los cuales son activos en contra de ciertos patógenos y pueden ser producidos por diferentes especies de *Lactobacillus* (Fernández *et al.*, 2003). A continuación se evalúa la presencia de estos compuestos durante las fermentaciones realizadas con los distintos microorganismos probióticos y compuestos prebióticos.

7.4.1. Producción de AGCC

En general, las bacterias ácido lácticas producen ácidos orgánicos a partir de carbohidratos no digeribles, preferentemente, ácido láctico y ácido acético (Saulnier *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha reportado que diferentes carbohidratos muestran diferentes patrones de producción de AGCC. Una explicación puede ser la diferencia en la composición monomérica de los carbohidratos. Por ejemplo, la lactulosa generalmente proporciona niveles bajos de ácido acético. Los oligosacáridos de bajo grado de polimerización generan niveles altos de ácido butírico (Nilsson y Nyman, 2005). En el presente trabajo, se observó la producción de ácido butírico con los prebióticos utilizados pero la concentración obtenida no fue mayor con respecto a l carbohidrato control (datos no mostrados). Así mismo, dada la importancia del ácido láctico debida a sus características metabólicas únicas involucradas en diversos procesos de fermentación de la leche, carne, cereales así como su efecto antimicrobiano directo también se determinó el efecto que ejercían los compuestos prebióticos sobre la producción de este metabolito. Los resultados mostraron que el consumo de Oligomate 55 incrementó significativamente la producción de ácido láctico (datos no mostrados).

La Tabla 7.7 muestra la producción de AGCC durante el consumo de diversos carbohidratos. Para la mayoría de los microorganismos, la concentración final de ácidos fue mayor con el consumo de carbohidratos prebióticos especialmente con Oligomate 55 con excepción de *L. casei* MB65 cuya producción fue mayor en lactosa y *L. helveticus* IMAU70129 que produjo mayor concentración de AGCC en inulina. El incremento en la producción de ácidos orgánicos concuerda con lo reportado por Desai *et al.* (2004); el consumo de prebióticos incrementó la producción para diversas cepas de *Lactobacillus* (*L. casei* ASCC 1520, *L. rhamnosus* ASCC 1521, *L. zae* ATCC 15820 y *L. paracasei* ASCC 292) en lactulosa e inulina.

Tabla 7.7. Producción de ácidos grasos de cadena corta.

[AGCC] mg/mL				
Microorganismo	Lactosa	Lactulosa	Inulina	Oligomate 55
<i>L. casei</i> Shirota	37.20	72.09	80.55	191.17
<i>L. casei</i> IMAU60214	72.84	89.14	68.17	155.15
<i>L. casei</i> MB65	87.47	33.52	33.26	75.18
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	64.01	53.38	127.35	104.85
<i>L. rhamnosus</i> GG	48.29	31.71	65.37	161.21
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	81.86	75.04	48.29	148.49

7.4.2. Producción de H₂O₂

La habilidad de los lactobacilos para generar H₂O₂ durante su crecimiento está bien documentada. La acumulación del H₂O₂ en el medio de cultivo puede ocurrir debido a que los lactobacilos no producen la enzima catalasa (Daeschel, 1989). De acuerdo con Caplice y Fitzgerald (1999), las BAL no poseen una verdadera catalasa, sin embargo, es posible que desarrollen un mecanismo específico para evitar el daño causado por la acumulación de H₂O₂ en el medio. El H₂O₂ también puede acumularse si en el medio de cultivo utilizado no contiene manganeso que cataliza la ruptura de H₂O₂ (Pridmore *et al.*, 2008). Batdorj *et al.* (2007) demostraron que la actividad antimicrobiana de *L. delbrueckii* T31 podría deberse a la producción de H₂O₂. También determinaron que la concentración mínima para que este compuesto presentara inhibición fue de 42.1 µg/mL y 32.2 µg/mL para *E. coli* y *L. innocua* respectivamente. Estas concentraciones son en la mayoría de los casos menores a las reportadas en la Tabla 7.8 por lo que además de la inhibición por AGCC, las cepas evaluadas pueden ser capaces de inhibir bacterias patógenas, en parte debido a la producción de H₂O₂.

Tabla 7.8. Producción de peróxido de hidrógeno.

H ₂ O ₂ (µg/mL)					
Microorganismo	Glucosa	Lactosa	Lactulosa	Inulina	Oligomate 55
<i>L. casei</i> Shirota	18.3 ± 1.2	2.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.4 ± 0.1	112.3 ± 4.5
<i>L. casei</i> IMAU60214	18.4 ± 3	5.7 ± 0.1	3.2 ± 0.1	5.6 ± 0.1	13.1 ± 1.2
<i>L. casei</i> MB65	343.5 ± 38.4	6.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	43.0 ± 0.3	260.0 ± 1.8
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	5.3 ± 0.4	2.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	3.3 ± 0.1	21.3 ± 1.2
<i>L. rhamnosus</i> GG	241.2 ± 32.9	2.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	19.5 ± 0.3	207.6 ± 0.3
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	184.4 ± 18.6	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	10.5 ± 0.1	97.1 ± 8.1

* Los resultados son el promedio de 4 determinaciones.

En un estudio realizado por Fooks y Gibson (2002), todas las cepas probióticas evaluadas (*L. plantarum*, *L. pentosus*, y *L. acidophilus*) mostraron inhibición sobre microorganismos patógenos. Así mismo, reportan que los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Jacobsen et al. (1999) en los que a través de investigaciones *in vitro* realizadas con cultivos puros se examinó la capacidad inhibitoria de 47 cepas de *Lactobacillus* y en el cual 28 de las cepas inhibieron a *E. coli*.

El potencial antimicrobiano exhibido por cada uno de los probióticos parece depender de la fuente de carbono utilizada. Los FOS, inulina y XOS generan más inhibición que la lactulosa, el lactitol y el almidón (Fooks y Gibson, 2002). Se adicionó glucosa al medio de cultivo para evaluar si la producción de H₂O₂ se incrementaba ya que en un estudio Villegas y Gilliland (1998) reportaron que la presencia de glucosa en el medio aumentaba significativamente la producción de este compuesto.

Tabla 7.9. Inhibición por compuestos antimicrobianos (%) producidos en diferentes fuentes de carbono.

Microorganismo indicador	Cepa antagonica					
	<i>L. casei</i> IMAU60214	<i>L. casei</i> Shirota	<i>L. helveticus</i> IMAU70129	<i>L. casei</i> MB65	<i>L. rhamnosus</i> KLDS	<i>L. rhamnosus</i> GG
Glucosa						
<i>E. coli</i>	13.6	4.3	14.6	2.5	10.4	14.9
<i>L. innocua</i>	44.6	7.1	58.7	22.8	54.3	49.4
<i>M. luteus</i>	0.0	30.1	0.0	54	0.0	0.0
Lactosa						
<i>E. coli</i>	12.5	0.0	14.8	17.6	0.0	8.2
<i>L. innocua</i>	43.4	21.7	4.2	0.0	0.0	2
<i>M. luteus</i>	0.0	0.0	0.0	40.1	17.8	0.0
Lactulosa						
<i>E. coli</i>	22.5	5.4	28.1	24.9	20.9	24.7
<i>L. innocua</i>	39.6	29.9	2.3	0.0	0.0	0.0
<i>M. luteus</i>	4.6	19.8	0.0	29.1	0.0	0.0
Inulina						
<i>E. coli</i>	29.4	10.6	19.1	23.9	32.9	36.1
<i>L. innocua</i>	49.8	0.0	52.6	0.0	0.0	28
<i>M. luteus</i>	0.0	22	0.0	24.5	0.0	0.0
Oligomate 55						
<i>E. coli</i>	41.1	28.4	40.1	31.4	53.7	52.6
<i>L. innocua</i>	39.8	25.3	40.9	4.6	42.6	41.5
<i>M. luteus</i>	0.0	14.7	0.0	25.2	0.0	0.0

* Los resultados son el promedio de 4 determinaciones. El error estándar fue siempre menor al 10% en todos los datos.

Los datos presentados en la Tabla 7.9 reportan el porcentaje de inhibición sobre distintas cepas indicadoras: *E. coli* K12, *L. innouca* y *M. luteus* generado por los diferentes compuestos antimicrobianos producidos por los microorganismos probióticos en las distintas fuentes de carbono. El porcentaje de inhibición corresponde al efecto generado probablemente por H₂O₂ o bacteriocinas ya que la inhibición por AGCC fue descartada al neutralizar las muestras obtenidas hasta un valor de pH de 7.

7.4.3. Producción de bacteriocinas

Si las interacciones antagonistas entre las BAL y otras bacterias no dependen de los bacteriófagos, las interacciones pueden ser causadas por metabolitos secundarios como el H₂O₂, los ácidos orgánicos, o las proteínas llamadas bacteriocinas (Lash *et al.*, 2005). Para determinar la naturaleza del compuesto inhibidor, a las muestras ya neutralizadas se les añadió catalasa para eliminar el H₂O₂ presente en el medio. Los datos presentados en la Tabla 7.10 muestran el porcentaje de inhibición debido probablemente a la presencia de compuestos como las bacteriocinas. Al comparar estos resultados con los contenidos en la Tabla 7.9 se puede apreciar que en muchos de los casos la inhibición era provocada únicamente por el H₂O₂ ya que después de la acción de la catalasa no se registró acción antagonista hacia las bacterias indicadoras.

Posteriormente se determinó la sensibilidad de los compuestos inhibidores aún presentes en el medio de cultivo a las enzimas proteolíticas. Todos los compuestos inhibidores fueron sensibles a la presencia de la proteinasa K ya que en todos los casos, el porcentaje de inhibición fue de cero lo que indicó su naturaleza proteica. De acuerdo con Fernández *et al.* (2003) si el compuesto tratado con proteinasa K es resistente a la misma, se puede descartar la hipótesis de que sea una bacteriocina, por lo que podría sugerirse la presencia de estos compuestos en el medio de cultivo evaluado ya que se ha reportado la producción de bacteriocinas utilizando compuestos prebióticos como sustrato (Chen *et al.*, 2007 y van de Gutche, 2001). Ogunbanwo *et al.* (2003) realizaron un estudio para demostrar la influencia de los componentes del medio de cultivo en la producción de bacteriocinas por *L. brevis* OG1 reportando que se sintetizaron mayores concentraciones de bacteriocinas cuando se adicionaba al medio 1 % p/v de glucosa. Sin embargo, en los resultados presentados en este trabajo no se observa una tendencia clara.

Tabla 7.10. Inhibición por bacteriocinas (%) producidos en diferentes fuentes de carbono.

Microorganismo indicador	Cepa antagonica					
	<i>L. casei</i> IMAU60214	<i>L. casei</i> Shiota	<i>L. helveticus</i> IMAU70129	<i>L. casei</i> MB65	<i>L. rhamnosus</i> KLDS	<i>L. rhamnosus</i> GG
Glucosa						
<i>E. coli</i>	0.0	0.0	10.3	0.0	0.0	5.9
<i>L. innocua</i>	15.6	0.0	22.3	22.8	35.9	33.9
<i>M. luteus</i>	0	22.8	0.0	54	0.0	0.0
Lactosa						
<i>E. coli</i>	12.5	0.0	14.8	0.0	0.0	0.0
<i>L. innocua</i>	2.8	21.3	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>M. luteus</i>	0.0	0.0	0.0	40.5	0.0	0.0
Lactulosa						
<i>E. coli</i>	15.1	5.5	22.6	8.8	9.2	0.0
<i>L. innocua</i>	4.1	15	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>M. luteus</i>	4.3	0.0	0.0	29.1	0.0	0.0
Inulina						
<i>E. coli</i>	28	12.6	13.8	24.3	0.0	0.0
<i>L. innocua</i>	2.2	0.0	10.4	0.0	0.0	0.0
<i>M. luteus</i>	0.0	0.0	0.0	24.5	0.0	0.0
Oligomate 55						
<i>E. coli</i>	12.9	15.4	28.1	0.0	11.5	3.7
<i>L. innocua</i>	12.7	15.1	4.1	0.0	23.9	10.3
<i>M. luteus</i>	0	10.1	0.0	28.2	0.0	0.0

* Los resultados son el promedio de 4 determinaciones. El error estándar fue siempre menor al 10% en todos los datos.

Ha sido ampliamente reportado que las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas no ejercen inhibición sobre bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *Salmonella*, a menos que la integridad de la membrana celular se vea comprometida por ejemplo después de un choque osmótico o un tratamiento con valores bajos de pH, con la presencia de detergentes o agentes quelantes (Daeschel, 1989; Stevens *et al.*, 1991; De Vuyst y Leroy, 2007), sin embargo más recientemente se ha reportado la acción de bacteriocinas en contra de bacterias Gram-negativas sin los tratamiento previamente mencionados. Simova *et al.* (2009) neutralizaron la presencia de ácidos orgánicos con NaOH y el efecto del H₂O₂ con catalasa y mediante la técnica de difusión en pozo obtuvieron inhibición sobre *L. innocua* CCP17 por parte de *L. rhamnosus* PC5 y *L. casei* además también se presentó inhibición contra *E. coli* por *L. rhamnosus* PC5 y *L. bulgaricus*. Al tratar las muestras con proteinasa K, se perdió la actividad inhibitoria.

Así mismo, en respuesta al hecho de que la producción de bacteriocinas activas contra bacterias Gram-negativas por BAL es más bien baja, se planteó la hipótesis de que el uso de los nuevos métodos turbidimétricos son más efectivos para detectar la actividad contra Gram-

negativas que los métodos convencionales. Diversos autores coinciden en que los métodos comúnmente aplicados para revelar la presencia de sustancias inhibidoras confían en la difusión de estas sustancias a través de un medio de crecimiento solidificado. Van de Gutche *et al.* (2001) demostraron la presencia de sustancias inhibidoras en el sobrenadante de un cultivo de *L. delbrueckii* VI1007 mediante la cuantificación de la turbidez, que no pudieron detectarse en el medio solidificado y que por tanto no fueron reportadas en las pruebas clásicas de inhibición.

Por su parte, Yaakoubi *et al.* (2009) probaron 300 cepas de BAL para la producción de bacteriocinas activas contra *L. innocua* y *E. coli*. Un total de 42 cepas mostraron actividad contra los dos microorganismos. Las sustancias antimicrobianas producidas por estas cepas fueron diferentes de los ácidos orgánicos y el H₂O₂ y sensibles a proteasas; por ello fueron consideradas como bacteriocinas. Estos autores, mostraron que la habilidad del método turbidimétrico para detectar la actividad de bacteriocinas producidas por BAL contra bacterias Gram-negativas es más efectiva que los métodos convencionales, ya que la detección de bacteriocinas había sido obstaculizada por la incapacidad de los métodos como la técnica de difusión en pozo que habían reportado un falso negativo.

En este trabajo se logró comprobar que las combinaciones simbióticas evaluadas tuvieron efectos benéficos diversos como la estimulación del crecimiento de las bacterias empleadas en productos comerciales influyendo además en la producción de metabolitos benéficos para la salud del ser humano como son los AGCC y las bacteriocinas. El punto más destacable fue el uso del índice prebiótico y la actividad prebiótica como herramientas para obtener un criterio cuantitativo que permita y facilite la rápida detección de combinaciones simbióticas útiles.

8. Conclusiones

- Se logró el aislamiento e identificación de 6 diferentes microorganismos probióticos a partir de productos comerciales.
- A través del índice prebiótico y la actividad prebiótica, se evaluó la capacidad de diferentes prebióticos (lactulosa, inulina y Oligomate 55) para mantener y estimular selectivamente el crecimiento de los microorganismos probióticos aislados, obteniéndose resultados satisfactorios con todas las combinaciones simbióticas posibles con excepción de *L. casei* Shirota e inulina.
- Se demostró el efecto prebiótico ejercido sobre los microorganismos probióticos a través del aumento en Y_{preb} , y el aumento en la μ .
- Se comprobó la presencia de diferentes compuestos antimicrobianos como AGCC, H_2O_2 y bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas.

9. Referencias

1. Alakomi, L.H., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. e I.M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (5): 2001-2005.
2. Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. e I. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. 17: 454-461.
3. Annuk, H., Shchepetova, J., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M. y M. Mikelsaar. 2003. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 403-412.
4. Baele, M., Vanechoutte, M., Verhelst, R., Vancanneyt, M., Devriese, L.A. y F. Haesebrouck. 2002. Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 50: 263-271.
5. Batdorj, B., Trinetta V., Dalgalarondo, M., Prevost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertle, T. y J.M. Chobert. 2007. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31 isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 103 (3): 584-593.
6. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). 2009. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
7. Boyd, M.A., Antonio, M.A.D. y S. Hillier. 2005. Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of *Lactobacillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (10): 5309-5311.
8. Cagigas, A.L. y J. Blanco. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 16 (1): 63-68.
9. Canchaya, C., Claesson, J., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. y P.W. O'Toole. 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology*. 152: 3185-3196.
10. Caplice, E. y G.F. Fitzgerald. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 131-149.

11. Chen, Y.S., Sriannual, S., Onda, T. y F. Yanagida. 2007. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocinas by lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 190-193.
12. Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. y P.E. Hernández. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 7 (4): 281-305.
13. Cotter, P.D., Hill, C. y R.P. Ross. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 777-787.
14. Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. 43: 164-167.
15. De Man, J.C., Rogosa, M. y M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 23 (1): 130-135.
16. De Vuyst, L. y F. Leroy. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13: 194-199.
17. Desai, R.A., Powell, B.I. y N.P. Shah. 2004. Survival and Activity of Probiotic Lactobacilli in Skim Milk Containing Prebiotics. *Journal of Food Science*. 89 (3): S57-S60.
18. Desai, R.A., Shah, N.P. e I.B. Powell. 2006. Discrimination of Dairy Industry Isolates of the *Lactobacillus casei* Group. *Journal of Dairy Science*. 89: 3345-3351.
19. Douglas, C.L. y M.E. Sanders. 2008. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *Journal of the American Dietetic Association*. 108: 510-521.
20. 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.
21. Fernández, M. F., Boris, S. y C. Barbés. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 449-455.
22. 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.
23. Gautam, N. y N. Sharma. 2009. Purification and characterization of bacteriocin produced by strain of *Lactobacillus brevis* MTCC 7539. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 46: 337-341.

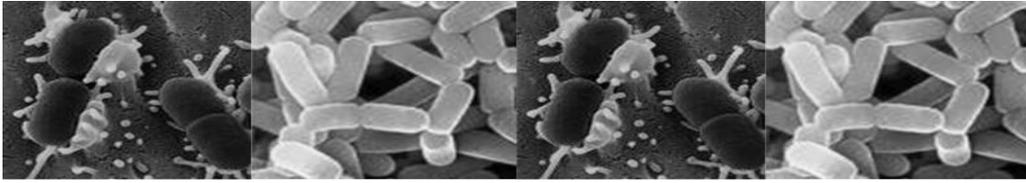
24. GenBank. National Center for Biotechnology Information. 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/upload.html>
25. Helander, I.M., von Wright, A. y T.M. Mattila-Sandholm. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trend in Food Science & Technology*. 8: 146-150.
26. Hijova, E. y Chmelarova, A. 2007. Short chain fatty acids and colonic health. *International Journal for Biomedical Sciences and Clinical Medicine*. 108 (8): 354-358.
27. Hintze, J. 2000. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.
28. Huebner, J., Wheling, L.R. y R.W. Hutkins. 2007. Functional Activity of Commercial Prebiotics. *International Dairy Journal*. 17 (7): 770-775.
29. Jacobsen, C.N., Rosenfeldt, N., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Parregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. y M. Jakobsen. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4949-4956.
30. Kaplan, H. y R.W. Hutkins. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacterias. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2682-2684.
31. Kaur, P.I., Chopra, K. y A. Saini. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15: 1-9.
32. Klocke, M. y K. Mundt. 2004. Development of a 16S rDNA-targeted PCR assay for monitoring of *Lactobacillus plantarum* and *Lact. Rhamnosus* during co-cultivation for production of inoculants for silages. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 267-273.
33. 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 and Disease*. 12: 27-34.
34. Lash, W.B., Mysliwiec, H.T. y H. Gourama. 2005. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*. 22: 199-204.
35. Lazarte R. y A. Morales. 2001. Probióticos. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*. 12 (2): 83-88.

36. Losada A.M. y T. Olleros. 2002. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutrition Research*. 22: 71-84.
37. Macfarlane, S. y G.T. Macfarlane. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 67-72.
38. Macfarlane, S., Macfarlane, T.G. y J.H. Cummings. 2006. Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 24: 701-714.
39. Macfarlane, T.G., Steed, H. y S. Macfarlane. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 305-344.
40. Makras, L., Van Acker, G. y L. De Vuyst. 2005. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (11): 6531-6537.
41. Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., R. Fondén, y M. Saarela. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12: 173-182.
42. Mobarez, A.M., Doust, H.R., Sattari, M. y N. Manthegui. 2008. Antimicrobial effects of bacteriocin like substance produced by *L. acidophilus* from traditional yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Journal of Biological Sciences*. 8 (1): 221-224.
43. Moura, P., Barat, R., Carvalheiro, F., Gírio, F., Loureiro-Dias, M.C. y M.P. Esteves. 2007. *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. 40: 963-972.
44. Nilsson, U. y M. Nyman. 2005. Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerization and solubility. *British Journal of Nutrition*. 94: 705-713.
45. Ogunbanwo, S.T., Sanii, A.I. y A. Onilude. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*. 2 (7): 179-184.
46. Olano, A. y N. Corzo. 2009. Lactulose as food ingredient. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89: 1987-1990.
47. Palframan, R., Gibson, G.R. y R. A. Rastall. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 281-284.

48. Pan, X., Wu, T., Zhang, L., Cai, L. y Z. Song. 2009. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. *Letters in Applied Microbiology*. 48: 362-367.
49. Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, Dasiou, D. e I. Ambrosiadis. 2006. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assesing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories*. 5 (30): 1-14.
50. Pirt, S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blakcwell Scientific Publications. Great Britain. 30-31 pp.
51. Pridmore, R.D., Pittet, A.C., Praplan, y C. Cavadini. 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role anti- *Salmonella* activity. *FEMS Microbiology Letters*. 283: 210-215.
52. PROFECO 2004. Bebidas lácteas fermentadas. *Revista del consumidor*. (4): 42-44.
53. Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K. y M.C. Adams. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*. 43: 1-7.
54. Ravula. R.R. y N.P. Shah. 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. *Biotechnology Techniques*. 12 (11): 819-822.
55. Roberfroid, M. 2007. Prebiotics: The concept revisited. *The Journal of Nutrition*. 137: 830S-837S.
56. 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.
57. Sanger Method. Dideoxynucleotide Chain Termination. 2008. <http://www.csu.edu/hcbio027/biotechnology/lec3/>
58. Saulnier, D.MA., Spinler, K.J., Gibson, G.R. y J. Versalovic. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 135-141.
59. Senok, C.A., Ismaeel, Y. A. y G.A. Botta. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*. 11: 958-966.

60. Sezer, C. y A. Güven. 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from food. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*. 15 (1): 45-50.
61. Simmering, R. y M. Blaut. 2001. Pro -and prebiotics -the tasty guardian angels? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 19-28.
62. Simova, E.D., Beshkova, D.B. y Zh.P. Dimitrov. 2009. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 692-701.
63. Stevens, A.K., Sheldon, W.B., Klapes, A. y T.R. Klaenhammer. 1991. Nisin Treatment for Inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (12): 3613-3615.
64. Swennen, K., Courtin, C.M. y J.A. Delcour. 2006. No-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46: 459-471.
65. Thammarutwasik, P., Hongpattarakere., Chantachum, S., Kijroongrojana, K., Itharat, A., Reanmongkol., Tewtrakul, S. y B. Ooraikul. 2009. Prebiotics- A review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 31 (4): 401-408.
66. Tharmaraj, N. y N.P. Shah. 2003. Selective Enumeration of *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science*. 86 (7): 2288-2296.
67. Todorov, S.D. y L.M.T. Dicks. 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology*. 45 (4): 312-322.
68. 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.
69. Van de Gutche, M., Ehrlich, D.S. y E. Maguin. 2001. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 147-153.
70. Vasiljevic, T. y N. P. Shah. 2008. Probiotics -From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*. 18: 714-728.
71. Villegas, E. y E. Gilliland. 1998. Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Lactis* I at 5°C. *Journal of Food Science*. 63 (6): 1070-1074.

72. Wang, Y. 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*. 42: 8-12.
73. 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
74. Yaakoubi, K., Benkerroum, N., Wiorowski, F., Sanson, F., Haydersah, J. e I. Chevallier. 2009. Development of a multiwall antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*. 17: 32-45.
75. Yeo, S.K. y M.T. Liong. 2009. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 267-275.



10. Publicación científica

Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403.

**ANTIMICROBIAL EFFECT OF *Lactobacillus casei* STRAIN SHIROTA
CO-CULTIVATED WITH *Escherichia coli* UAM0403**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE *Lactobacillus casei* VARIEDAD SHIROTA
CO-CULTIVADO CON *Escherichia coli* UAM0403**

I. Figueroa-González¹, H. Hernández-Sánchez², G. Rodríguez-Serrano¹, L. Gómez-Ruiz¹, M. García-Garibay¹ and A. Cruz-Guerrero^{1,*}

¹ Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.,
Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina, México D.F. 09340, México.

² Departamento de Alimentos Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN,
Prolongación Manuel Carpio S/N. Col. Plutarco Elías Calles, México D.F. 11350, México.

Received 1 of October 2009; Accepted 22 of December 2009

Abstract

In order to assess the antimicrobial effect of *L. casei* Shirota and prebiotic effect of a galactoside (Oligomate 55), co-cultures of this probiotic bacterium and *Escherichia coli* were made in an *in vitro* fermentation with temporary and physicochemical characteristics of key regions of large bowel. Simulations of ascending colon, transverse colon and descending colon were used. With Oligomate 55 an enhancement of up to three-fold of the growth of *L. casei* Shirota was observed compared to glucose; then, our results confirmed that Oligomate 55 had a prebiotic effect on *L. casei* Shirota, stimulating its growth. In all studied regions *L. casei* Shirota had a bacteriostatic effect on *E. coli* UAM0403. Our results showed the prebiotic effect of Oligomate 55 on *L. casei* Shirota. Despite Oligomate 55 significantly stimulated the growth of *L. casei* Shirota, *E. coli* UAM0403 was able to grow with Oligomate 55 in the same amount as with glucose. These kinds of studies are important to be considered for an adequate selection of prebiotics as a critical step during synbiotic development.

Keywords: galactooligosaccharides, prebiotic; probiotic.

Resumen

Para determinar el efecto antimicrobiano de una bacteria probiótica y el efecto prebiótico del Oligomate 55, se realizaron fermentaciones *in vitro* de co-cultivos de *L. casei* Shirota y *E. coli* UAM0403, reproduciendo características temporales y fisicoquímicas de ciertas regiones del intestino grueso. Las regiones simuladas fueron colon ascendente, colon transverso y colon descendente. En todas las regiones simuladas, *L. casei* Shirota mostró un efecto bacteriostático sobre *E. coli* UAM0403. Se observó un incremento en la población de *L. casei* Shirota; la cual se triplicó al utilizar Oligomate 55. Los resultados obtenidos mostraron el efecto prebiótico del Oligomate 55 sobre *L. casei* Shirota. El azúcar prebiótico Oligomate 55 fue capaz de estimular el crecimiento de *L. casei* Shirota, sin embargo, *E. coli* UAM0403 fue capaz de crecer con esta fuente de carbono a la misma proporción que en glucosa. Por lo tanto, para prevenir la utilización de prebióticos por bacterias patógenas, se debe realizar una adecuada selección de la fuente de carbono para el desarrollo de productos simbióticos.

Palabras clave: galactooligosacáridos, prebióticos, probióticos.

* Corresponding author. E-mail: aec@xanum.uam.mx
Tel. (55) 58044720; Fax: (55) 58044712

1. Introduction

Probiotics, prebiotics and synbiotics are based on the same idea: to create foodstuffs which after ingestion multiply healthy bacteria in the intestine (de Vrese and Schrezenmeir, 2008). Probiotics are living organisms that, when ingested in certain amounts, are capable of maintaining the balance of the intestinal microbiota, while prebiotics are carbohydrates that enhance the development of probiotics (Senok *et al.*, 2005).

The ability of lactic acid bacteria to inhibit the growth of pathogenic bacteria is well known. According to Hua *et al.* (2007) lactobacilli are able to compete with pathogenic bacteria when they were incubated together, but the degree of inhibition was bacterial strain depended. The inhibition produced by lactic acid bacteria may be due to the production of organic acids such as lactic, propionic and acetic (Naaber *et al.*, 2004), hydrogen peroxide, bacteriocins, bacteriocins-like substances and possibly biosurfactants which are active against certain pathogens and may be produced by different species of *Lactobacillus* (Millete *et al.*, 2006).

Lactobacillus casei strain Shirota, one of the most intensively studied probiotics, has been used in the production of fermented milk products for more than 70 years, and has been proven as an important probiotic with many benefits, such as the improvement of the balance of intestinal microbiota and volatile fatty acids, antitumor action, stimulation of the immune system, and antimicrobial activity (Fujimoto *et al.*, 2008).

Prebiotics are food ingredients that stimulate selectively the growth and activity of bifidobacteria and lactobacilli in the gut and thereby to promote health. Prebiotics are non-digestible oligosaccharides which reach the human colon without being hydrolyzed or absorbed in the upper part of the gastrointestinal tract (Chockchaisawasdee *et al.*, 2004). Therefore, the crucial property of prebiotics is their effect on the microbiota of large bowel (Cummings and Macfarlane, 2002). It has been postulated that prebiotics are metabolized only by beneficial microorganisms; then, they are able to alter the composition of the gut microbiota (Macfarlane *et al.*, 2006). Among the wide variety of compounds tested as prebiotics, galactooligosaccharides and fructooligosaccharides are the most studied (Crittenden and Playne, 1996; Voragen, 1998). Oligosaccharides such as Oligomate 55 are currently industrially produced to be incorporated into food products. Oligomate 55 is the trade mark of a sugar formed by the trans-

galactosilation of β -galactosidase on lactose, and consists mainly of galactooligosaccharides which main component is 4'-galactosil-lactose and other components such as lactose and monosaccharides (Sar *et al.*, 2004).

The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of *Lactobacillus casei* Shirota in co-culture with *E. coli* UAM0403 during fermentation in an *in vitro* simulation of large bowel, using the commercial prebiotic Oligomate 55 as selective agent to improve growth of probiotic bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Lactobacillus casei strain Shirota, isolated from Yakult (Yakult, México) and *Escherichia coli* UAM 0403 was obtained from the culture collection of the Universidad Autónoma Metropolitana. *L. casei* Shirota was maintained in Skim Milk medium (Difco, Detroit, USA) and *E. coli* UAM0403 in Nutritive Agar (B. D. Bioxon, México). Cultures were stored at 4°C in their respective media.

Lactobacillus casei Shirota isolation was performed as previously described (Tharmaraj and Shah, 2003) with minor modifications. Briefly, 1 ml of sample (Yakult) was 10-fold serially diluted (10^3 to 10^7) in sterile peptone water (casein peptone at 0.1%, pH 7.2) and stirred thoroughly. After, 100 μ l of each dilution was spread on de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar for lactic acid bacteria (Difco, Detroit, USA), MRS-NaCl (40 g/l NaCl) agar for *Lactobacillus casei* isolation. The agar plates were incubated at 37°C for 72 h. Isolated bacteria were examined microscopically for cellular morphology and Gram stain phenotype.

2.2. Culture medium

Culture medium was prepared according to Macfarlane *et al.* (1998). The medium contained (g/l): either glucose (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) used as control, or Oligomate 55 (Yakult Pharmaceutical, Japan), 0.4; Yeast Extract (B. D. Bioxon, México), 3; Proteose-Peptone (B. D. Bioxon, México), 1; NaHCO_3 , 0.4; NaCl , 0.08; K_2HPO_4 , 0.04; KH_2PO_4 , 0.04; CaCl_2 , 0.008; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.008 (all salts were purchased by J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA); and Tween-80, 1 ml/l (Sigma, St. Louis, MO, USA). Initial pH was adjusted according to every step of the fermentation with HCl 0.1 M.

2.3. Co-culture conditions

The co-culture growth of *E. coli* UAM0403 and *L. casei* Shirota was performed in 50 ml vessels containing 30 ml culture medium, reproducing significant physicochemical characteristics in large bowel (ascending colon, transverse colon and descending colon). Conditions were achieved by maintaining physiological temperature (37 °C), stirring (150 rpm) and residence time as occurring in humans (Macfarlane *et al.*, 1998). Vessels were incubated in an orbital shaker with temperature control (Environ Shaker, New Brunswick, New Jersey, USA) under the following conditions of initial pH and residence time: ascending colon, 5.5 and 8 h; transverse colon, 6.2 and 12 h; descending colon, 6.8 and 10 h. Each region was simulated separately and continuity was kept by transferring 1 ml inoculum from the first vessel (region) to the next in the order presented above. At the end of the cultures the pH values of each region were measured.

2.4. Microbial growth quantification

The co-cultures were carried out in 50 ml vessels containing 30 ml culture medium starting with 10^6 colony-forming units (CFU) of *L. casei* Shirota and *E. coli* UAM0403 (inoculated with 1% v/v of an overnight culture obtained from a single colony). The control medium contained glucose and the test medium Oligomate 55 as carbon source. At the same time, control experiments for growth testing of both microorganisms in single cultures were made at same conditions. Samples were taken periodically in order to evaluate the concentration of each species during fermentation. Bacterial growth was followed by plate culture method on selective media. For *E. coli* UAM0403 EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar, B. D. Bioxon, México) was used, while *L. casei* Shirota was pour-plated on Lactobacilli MRS Agar (Difco, Detroit, USA). All the dishes were incubated at 37°C from 24 to 48 hours, and UFC/mL were counted.

2.5. Statistical analysis

The fermentation experiments were carried out in duplicate. For each replication, three samples were analyzed. Student-t test ($p < 0.05$) was performed using the statistics software NCSS 2000 (NCSS, LLC, Utah, USA) in order to determine if there is a significant difference between the generation time of the *E. coli* UAM0403 in presence or absence of probiotic bacterium.

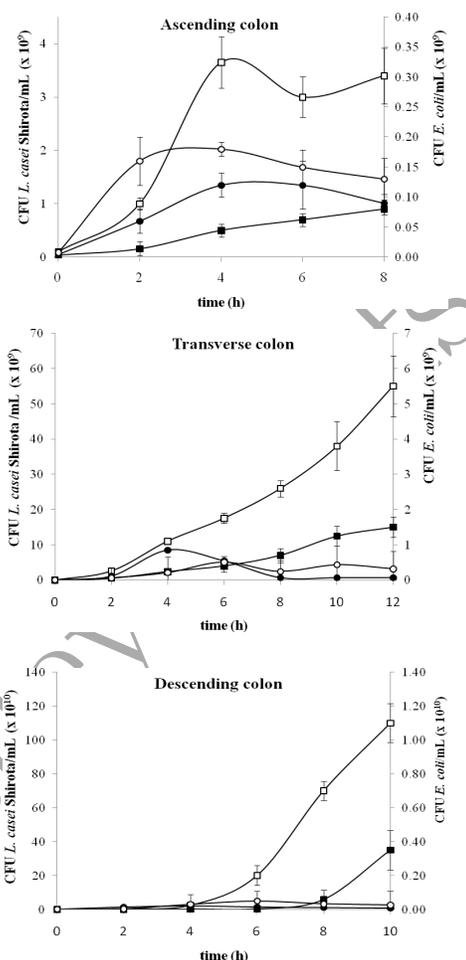


Fig. 1: Growth of *Lactobacillus casei* Shirota and *Escherichia coli* UAM0403 in co-culture. Growth curves for *L. casei* Shirota (squares) and *E. coli* (circles) with glucose (filled symbols) and Oligomate 55 (open symbols) as carbon sources. Bars correspond to the standard error of the mean ($n = 3$).

3. Results and discussion

Fig. 1 shows the growth of *L. casei* Shirota and *E. coli* UAM0403 in each studied region of large bowel. *L. casei* Shirota using both glucose and Oligomate 55 as carbon sources showed a significantly higher growth compared to *E. coli* UAM0403. The growth of *L. casei* Shirota also presented a significant increase with Oligomate 55 as carbon source compared to glucose. A maximum enhancement up to 3-fold (ascending colon, 4 h) was found.

Fig. 2 summarizes growth of both strains at the end of fermentation, growth of *L. casei* Shirota was similar in both co-culture with *E. coli* UAM0403 and single culture (control). On the oth-

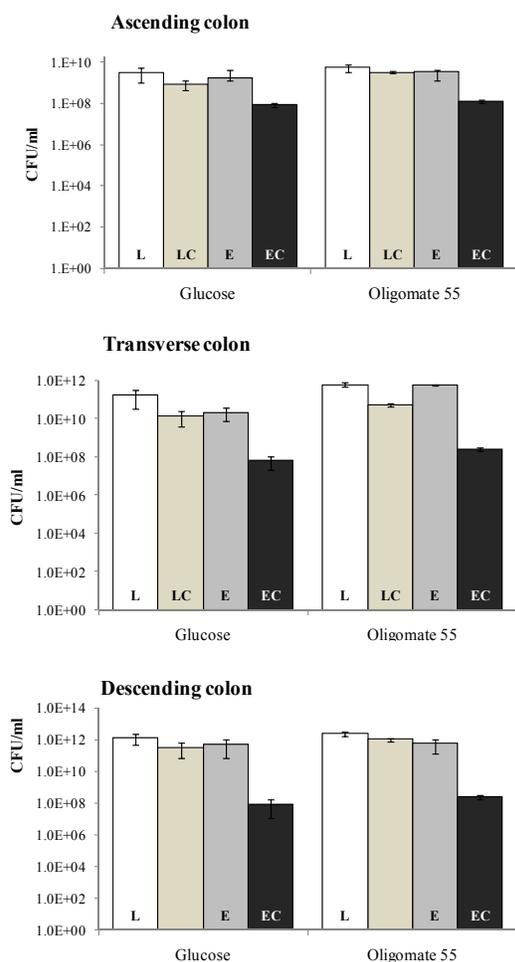


Fig. 2: Comparison between growth of *Escherichia coli* UAM0403 and *Lactobacillus casei* Shirota at final fermentation time. *Lactobacillus casei* Shirota in monoculture (L); *Escherichia coli* UAM0403 in monoculture (E). Microorganisms in co-culture was represented by LC for *L. casei* Shirota and EC for *E. coli* UAM0403.

er hand, the growth of *E. coli* decreased in presence of *L. casei* Shirota, therefore, the ability of *L. casei* Shirota to inhibit the growth of *E. coli* UAM0403 was established in these co-culture experiments. In presence of *L. casei* Shirota, growth of harmful microorganism decreased by a 4 log (descending colon, pH 6.8) compared with control. A small reduction of 2 log at transverse colon (pH 6.2) and 1 log in ascending colon (pH 5.5) in *E. coli* UAM0403 counts was also observed.

Data in the current study shown that in co-culture, *Lactobacillus casei* Shirota inhibits the growth of *E. coli* UAM0403. In contrast, growth of *Lactobacillus casei* Shirota was not influenced by presence of harmful bacterium. As shown in

Fig. 1, Oligomate 55 enhanced significantly the growth of *L. casei* Shirota ($P < 0.05$) compared to glucose in all studied regions. This main result agrees with Palframan *et al.* (2002); these authors observed that lactic bacteria were capable to metabolize Oligomate 55 (1%) at pH 6 during mixed cultures with gut bacteria. Later, Huebner *et al.* (2007) studied several lactobacilli strains in batch cultures, founding a higher growth of *L. plantarum* 4008, *L. acidophilus* NCFM and *L. acidophilus* 33200 in Oligomate 55 compared to glucose.

A bacteriostatic effect of *L. casei* Shirota was observed in all regions. The growth of *E. coli* was significantly lower compared to *L. casei* Shirota; however, *E. coli* UAM0403 was able to grow in both carbon sources without significant differences in practically all regions. This can be explained by the fact that Oligomate 55 contains free monosaccharides such as glucose and galactose in more than 18% w/w (Sar *et al.*, 2004). These results indicate that the inhibition of *E. coli* was due to the presence and metabolic activity of *L. casei* Shirota instead an effect of Oligomate 55.

In this study, was observed that the lowest pH value was reached in the ascending colon with Oligomate 55; cultures under these conditions showed the maximum pH reduction (from 5.5 to 4.1) as well as the maximum enhancement of *L. casei* Shirota growth. The minimum reduction of pH value (from 6.2 to 6.1) was found in the transverse colon with Oligomate 55, only under these conditions *E. coli* UAM0403 showed a significant growth compared to glucose. In all regions a slightly decrease in the pH value was observed, with a maximal decrease of 1.4 pH units (ascending colon with Oligomate 55). This result agrees with Fooks and Gibson (2002); who found that in 24-h cultures of *L. plantarum* 0407 and *E. coli* with fructooligosaccharides as carbon source, the pH value diminished only 1.15 units; however, inhibition of *E. coli* did occur. This suggests that besides organic acids production, other inhibitory metabolites could be produced during this kind of cultures. Brink *et al.* (2006) reported that lactic acid bacteria, such as *L. casei* LHS, produces a high level of antimicrobial activity when growing in MRS broth supplemented with glucose; they found that antimicrobial compounds with bacteriostatic effect were produced during cultures. Moreover, Millette *et al.* (2006) observed that a culture of *L. acidophilus* and *L. casei* inhibited or delayed the growth of pathogens such as *E. coli*; these authors suggested that antimicrobial activity could be due to production of organic acids and bacteriocins. Lactobacilli may exert their antibacterial activi-

Table 1. Generation time (g) of *E. coli* UAM0403 in single and co-culture with *L. casei* Shirota.

	Single culture (min)	Co-culture (min)
Glucose		
Ascending colon	28.2± 2.3 ^a	55.4± 2.8 ^b
Transverse colon	19.3± 1.7 ^a	54.8± 2.5 ^b
Descending colon	14.4± 1.1 ^a	48.8± 2.1 ^b
Oligomate 55		
Ascending colon	27.9± 2. ^a	61.9± 3.1 ^b
Transverse colon	18.7± 1.8 ^a	39.9± 2.6 ^b
Descendent colon	16.2± 1.5 ^a	53.4± 2.8 ^b

^{a,b}Different letters within the same row indicate a significant difference between generation time of *E. coli* UAM0403 and in co-culture with *L. casei* Shirota (P<0.05).

ty through production of lactic acid and others metabolites such as hydrogen peroxide and short chain fatty acids. Also specific antibacterial compounds such as antibiotics or bacteriocins have been identified in the culture medium of several lactic acid bacteria. The mechanisms by which *L. casei* Shirota inhibited *E. coli* UAM0403 growth remain understood at present.

Generation times of *E. coli* UAM0403 are presented in Table 1. Data shown a significantly increase of bacteria generation time when grow in the presence of *L. casei* Shirota. *E. coli* UAM0403 had a generation time of 28.2 min when cultured alone in glucose media whereas the presence of the lactobacilli increased the generation time to 55.4 min. Also was observed decrease in generation time of *E. coli* UAM0403 in the simulation of the colon when it is in monoculture, indicating an adaptation of the microorganism to means. Whereas in co-culture, generation time is similar in the different regions from colon, this, suggests an effect of lactobacilli in growth of *E. coli* UAM0403. Neither, a prebiotic effect was observed in generation time of *L. casei* Shirota.

Conclusions

The results obtained indicate that the probiotic culture was able to inhibit the growth of a harmful

bacterium. Moreover, results obtained in this work confirmed the effect prebiotic of Oligomate 55 during simulations of key regions of large bowel. Even though in all regions a bacteriostatic effect on *E. coli* UAM0403 was obtained, it was able to grow in both carbon sources, implying that this microorganism was capable to metabolize Oligomate 55. Further experiments must be done in order to determine which components of Oligomate 55 could be potentially consumed by other pathogens; this information may be useful in the design and optimization of synbiotics. Additional studies on antimicrobial compounds production must be done to a better understanding of the bacteriostatic effect of *L. casei* Shirota on *E. coli* UAM0403 and other microorganisms.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support received from the National Council for Science and Technology (CONACyT), No. 0471-O.

References

- Brink, M., Todorov, S.D., Martin, J.H., Senekal, M. and Dicks, L.M.T. (2006) The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology* 100, 813-820.
- Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V.I., Niranjan, K. and Rastall, R.A. (2004) Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: studies on batch and continuous UF membrane - fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 434-443.
- Crittenden, R. G. and Playne, M. J. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* 7, 353-361.
- Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T. (2002) Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition* 87 (Suppl. 2), S145-S151.
- De Vrese, M. and Schrezenmeir, J. (2008) Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 111, 1-66.
- Fooks, L.J. and Gibson, G.R. (2002) *in vitro* investigations of the effect of probiotics and

- 351 prebiotics on selected human intestinal pathogens. *352 FEMS Microbiology Ecology* 39, 67-75. 402
- 353 Fujimoto, J., Matsuki, T., Sasamoto, M., Tomii, 403
354 Y. and Watanabe, K. (2008) Identification 404
355 and quantification of *Lactobacillus casei* strain 405
356 Shiota in human feces with strain-specific 406
357 primers derived from randomly amplified poly- 407
358 morphic DNA. *International Journal of Food* 408
359 *Microbiology* 126, 210-215. 409
- 360 Hua, W., Yang, X., Yonghua, X., Feng, X. and 410
361 Gengpin, L. (2007) Synergistic antidigestion 411
362 effect of *Lactobacillus rhamnosus* and bovine 412
363 colostrums in simulated gastrointestinal tract 413
364 (*in vitro*). *Applied Microbiology and Biotech-*
365 *nology* 75, 619-626.
- 366 Huebner, J., Wehling, R.L. and Hutkins, R.W.
367 (2007) Functional activity of commercial pre-
368 biotics. *International Dairy Journal* 17, 770-
369 775.
- 370 Macfarlane, G.T., Macfarlane, S. and Gibson, G.R.
371 (1998) Validation of a Three-Stage compound
372 culture system for investigating the effect of
373 retention time on the ecology and metabolism
374 of bacteria in the human colon. *Microbial*
375 *Ecology* 35, 180-187.
- 376 Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. and Cummings
377 J.H. (2006) Review article: prebiotics in the
378 gastrointestinal tract. *Alimentary Pharma-*
379 *cology and Therapeutics* 24, 701-713.
- 380 Millette, M., Luquet, F.M. and Lacroix, M. (2006)
381 *in vitro* growth control of selected pathogens
382 by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacil-*
383 *lus casei*-fermented milk. *Letters in Applied*
384 *Microbiology* 44, 314-319.
- 385 Naaber, P., Smidt, I., Stsepetova, J., Brilene, T.,
386 Annuk, H. and Mikelsaar, M. (2004) Inhi-
387 bition of *Clostridium difficile* strains by in-
388 testinal *Lactobacillus* species. *Journal of Med-*
389 *ical Microbiology* 53, 551-554.
- 390 Palframan, R.J., Gibson, G.R. and Rastall, R.A.
391 (2002) Effect of pH and dose on the growth
392 of gut bacteria on prebiotic carbohydrates
393 *in vitro*. *Anaerobe* 8, 287-292.
- 394 Sar, C., Santoso, B., Mwenya, Y., Gamoa, T.,
395 Kobayashi, R., Morikawa, K., Kimura, H.,
396 Mizukoshi, J. and Takahashi, J. (2004) Ma-
397 nipulation of rumen methanogenesis by the
398 combination of nitrate with β 1-4 galacto-
399 oligosaccharides or nisin in sheep. *Animal*
400 *Feed Science and Technology* 115, 129-142.
- Senok, A.C., Ismaeel, A.Y. and Botta, G.A. (2005)
Probiotics: facts and myths. *Clinical Micro-*
biology and Infection 11, 958-966.
- Tharmaraj, N. and Shah N. P. (2003) Selective
Enumeration of *L. Delbruecki* ssp. *bulgari-*
cus, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacil-*
lus acidophilus, Bifidobacteria, *Lactobacillus*
casei, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propi-
onibacteria. *Journal of Dairy Science* 86 (7),
2288-2296.
- Voragen A.G.J. (1998) Technological aspects of
functional food-related carbohydrates. *Trends*
in Food Science and Technology 9, 328-335.

México, D.F., a 16 de marzo de 2010

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

Estudio de prebióticos en el crecimiento de bacterias probióticas comerciales y en la síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana

Que presentó

M.B. Ivonne Figueroa González

Directora:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero



Jurado:

Dr. José Mariano García Garibay (Presidente)



Dra. María de Lourdes Pérez Chabela (Secretario)



Dra. María de Lourdes Escamilla Hurtado (Vocal)



Dr. Humberto Hernández Sánchez (Vocal)