



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**AVANCES EN LA UTILIZACION DE
BACTERIAS PROBIOTICAS**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
MARIA CATALINA CARDENAS ASCENCION**



MEXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2005

m350890



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente: Prof. Raúl Aguilar Caballero

Vocal: Prof. Olga Velázquez Madrazo

Secretario: Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López

1er. Suplente: Prof. Luciano Hernández Gómez

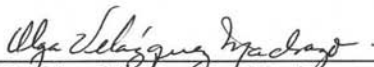
2do. Suplente: Prof. Francisco Ruiz Terán

**Sitio donde se desarrolló el
tema:**

Bibliotecas de la UNAM: Facultad de Química, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Otras bibliotecas: Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias de la Salud "Salvador Zubirán".

Asesor:



Q. F. B. Olga Velázquez Madrazo

Sustentante:



María Catalina Cárdenas Ascención

∞ AGRADECIMIENTOS ∞

- ★ Primero quiero agradecer a **la vida** que me ubicó en este tiempo, y en este espacio, donde he encontrado todo lo que necesito para disfrutar mi estancia aquí, como integrante de una gran familia, con unos amigos valiosos y una pareja excepcional.

- ★ También quiero agradecer a **la Universidad Nacional Autónoma de México**, que me ha permitido formarme profesionalmente dentro de sus aulas dándome las herramientas para ser una persona productiva a mi país.

- ★ A la **Q.F.B. Olga Velázquez Madrazo**, por su participación como asesor en la elaboración del presente trabajo y principalmente por sus valiosos comentarios.

- ★ A los integrantes del jurado asignado, a la profesora **Beatriz de Guadalupe Serrano López** y al **profesor Raúl Aguilar Caballero**, por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

- ★ A mis grandes amigos, **Rosa, Nancy, Amalia y Alejandro**, por compartir conmigo no solo clases y practicas, sino la vida en la universidad, haciendo su paso por ella aun más interesante y cuya amistad ha pasado las fronteras de la escuela.

- ★ A la persona que sin pensarlo, dio un giro a mi vida y a la de mi familia, encontrando nuevos caminos que han permitido que hoy me encuentre en este sitio. **Gracias Señora Alicia Villanueva.**

∞ DEDICATORIAS ∞

Quiero dedicar este trabajo a toda mi familia, por su apoyo incondicional para seguir adelante aun en los momentos difíciles:

- ★ A ti **mamá**, por confiar en cada uno de nosotros, alentándonos a continuar, buscando siempre la manera de apoyarnos.
- ★ A ti **papá**, por darlo todo en el trabajo para que cada uno de tus hijos siga en lo que quiere.
- ★ A ustedes, **Toño, Martha, Yaya, Marisol, Carlos y Diana**, mis muy, muy queridos hermanos, con quienes he aprendido a convivir, a compartir, a escuchar, a disfrutar y con quienes sé que puedo contar incondicionalmente.
- ★ A ti mi amor, por ser el maravilloso ser humano que eres, por tus oportunos "jalones de oreja" y tu apoyo moral, porque a cada paso que das, me enseñás no sólo a mí, sino a los que te rodean, que todo en esta vida hay que hacerlo con entrega. **Te amo Pablo.**
- ★ También quiero dedicarlo a la nueva integrante de la familia, a **Ximena**, por la alegría que ha traído consigo.

CAPÍTULO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVO.....	6
III. ANTECEDENTES.....	8
IV. EL TRACTO GASTRO-INTESTINAL.....	15
V. CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS...	26
VI. MECANISMOS DE ACCIÓN.....	41
VII. APLICACIONES.....	58
VIII. DISCUSIÓN.....	63
IX. CONCLUSIONES.....	66
X. BIBLIOGRAFÍA.....	70

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Con los estudios realizados por Metchnikoff (Lourens-Hattingh, 2001), desde principios del siglo XX ha llamado la atención de la comunidad científica el papel del equilibrio de la flora gastrointestinal, como un requisito para mantener la salud y prevenir algunas enfermedades.

Muchos estudios se han enfocado a la flora intestinal, debido a que influye directa e indirectamente en el estado de salud tanto del ser humano como de animales, a través de las siguientes funciones:

- Producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta.
- Degradación de sustancias alimenticias no digeridas.
- Protección de la integridad del epitelio intestinal.
- Estímulo de la respuesta inmunitaria.
- Protección frente a los microorganismos enteropatógenos.

En condiciones específicas, tanto los seres humanos como los animales presentan determinada flora gastrointestinal.

Factores exógenos tales como: cambios en la alimentación, infecciones y parasitismo, tratamientos con antibióticos, estrés etc, provocan la ruptura del equilibrio intestinal y todo el sistema digestivo se ve afectado en mayor o menor grado.

El primer síntoma de esta ruptura es la diarrea, expresión de la debilidad de las defensas intestinales que permite a los gérmenes patógenos implantarse, adherirse y proliferar en las células epiteliales del intestino. La diarrea no sólo representa un déficit en la absorción del agua sino también de numerosas sustancias nutritivas. En el campo de la producción animal, estas alteraciones representan grandes pérdidas económicas debido a que con frecuencia pueden conducir a la muerte del animal.

Durante muchos años se han utilizado antibióticos como tratamiento contra la invasión de bacterias patógenas, sin embargo, el uso indiscriminado de éstos en los humanos y en medicina veterinaria, ha causado que la resistencia a antibióticos sea una característica cada vez más común en los microorganismos; esto a su vez, hace que el tratamiento de las infecciones sea actualmente un problema muy serio.

La prescripción ilimitada de antibióticos no sólo ha permitido un incremento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, sino también está asociada con el daño a la flora protectora, conduciendo a la predisposición hacia las infecciones. El abuso generalizado en el uso de antibióticos, se ha señalado como una de las principales causas de estos desórdenes. Por esa razón el control de infecciones a través de un enfoque no-antibiótico es urgentemente necesario, y las terapias de reposición bacteriana usando bacterias de la flora natural representa una alternativa prometedora. (Forestier, 2001)

Puesto que los factores determinantes de la ruptura del equilibrio de la flora intestinal son múltiples, y la prevención de este desequilibrio en la producción animal adquiere un gran significado económico, es fácil comprender las razones por las cuales han sido numerosas las investigaciones dirigidas a la obtención de productos químicos o biológicos, capaces de evitar o prevenir las alteraciones en el ecosistema digestivo. Fruto de estas investigaciones ha sido el descubrimiento de microorganismos específicos que, administrados regularmente, son capaces de mantener la normalidad de la flora intestinal de los animales.

Sobra decir en lo que se refiere a los seres humanos también hay un gran interés por asegurar su bienestar y evitar tanto los daños causados por infecciones intestinales, como por el uso indiscriminado de antibióticos. Además, cabe recordar que el uso de antibióticos para animales dedicados a la producción de alimentos, afecta también, a través de éstos a los seres humanos.

El uso de bacterias probióticas es una alternativa al uso de antibióticos, propuesta para mantener el equilibrio en la microflora intestinal.

Los probióticos son definidos como: suplementos alimenticios microbiales vivos los cuales afectan benéficamente al hospedero, dándole un balance microbiano intestinal (Fuller, 1989) que se espera que prevenga desórdenes digestivos y/o incremente el desempeño del animal. (Bernardeau, 2002).

Durante mucho tiempo algunos médicos han sido escépticos respecto a la prescripción de productos probióticos como coadyuvantes en la terapia de alteraciones gastrointestinales, debido en parte, a afirmaciones exageradas e injustificadas, usadas en la publicidad y mercadeo de esos productos. Muchos reportes de sus beneficios para la salud han sido publicados con poco apoyo científico. Lo que es más, muchos de los microorganismos incluidos en esos productos no están viables y no han sido elegidos por sus propiedades benéficas específicas o por su habilidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal. (Collins, 1998).

Los consumidores modernos están cada vez más interesados en su salud personal, y esperan que los alimentos que comen, además de agradables y nutritivos, sean seguros y saludables, y capaces de prevenir enfermedades. Los consumidores están mejor informados que nunca y son entusiastas para tomar decisiones proactivas con respecto a su salud. Los consumidores se han vuelto cada vez más concientes de los efectos benéficos para la salud de algunos alimentos, por ejemplo los fermentados.

Con la conciencia tomada por los consumidores sobre el consumo de alimentos que aporten "más" que nutrientes, surgen los llamados alimentos funcionales.

Este creciente interés por las dietas saludables está estimulando el desarrollo de nuevos productos en la industria de alimentos, en su búsqueda por satisfacer las

exigencias de los consumidores. En el campo de los probióticos se tienen particularmente enfocados los lactobacilos de origen intestinal. (Kullisaar, 2002). Hay gran demanda de productos con estas cepas y se están requiriendo nuevos procesos y formulaciones para utilizar cepas especialmente seleccionadas por su efectos para la salud. (Puupponem-Pimiä, 2002).

La industria alimentaria ha reconocido esta situación y ha comercializado alimentos que contienen probióticos, casi siempre con leche como vehículo. Así mismo, ha mejorado los microorganismos presentes en sus productos. La cantidad es más o menos estable y mayor si se compara con los productos fermentados en forma natural. También ha mejorado la calidad de los microorganismos de alimentos comercializados con agentes probióticos. No obstante, las cepas de probióticos en los alimentos comerciales no garantizan su eficacia médica. Hoy en día, las bacterias probióticas son ampliamente usadas en quesos y leches fermentadas. (Vinderola, 2002)

El mercado de los microorganismos probióticos se encuentra en aumento, ya sea como alimentos funcionales o como suplementos alimenticios. Por ello, surge la necesidad de reunir la información generada durante las investigaciones más recientes; y en particular, el interés por desarrollar este trabajo, buscando específicamente los avances que explican los mecanismos de acción de los probióticos, ya que hasta la década de los 90's prevalecieron los estudios sobre sus efectos.

CAPÍTULO II

“OBJETIVO”

OBJETIVO:

Presentar los avances científicos más recientes en el campo de los probióticos, específicamente de los microorganismos y cepas más utilizadas y los mecanismos de acción que explican los efectos benéficos reportados.

CAPÍTULO III

“ANTECEDENTES”

ANTECEDENTES

A través de la historia, el hombre ha aprendido diferentes formas de utilizar las bacterias lácticas. Tradicionalmente las ha empleado para elaborar algunos productos alimenticios fermentados, heredando por generaciones la tecnología de la fermentación. Las aplicaciones de los microorganismos datan de tiempos inmemoriales. El hombre hizo uso de ellos sin saber que éstos existían, desde que inventó o descubrió al azar la manera de hacer cerveza, vinagre, vino y pan.

Las Sagradas Escrituras relatan la manera como Noé descubrió el vino a partir de la fermentación del jugo de uva. Los griegos y los romanos aprendieron de los egipcios su elaboración y se preocuparon por mejorar el sabor y los sistemas de conservación. (De Flores, 1995). La cerveza era conocida antes del año 6,000 a. C. por sumerios y babilonios, y en el antiguo Egipto existía ya verdadera producción en 1,700 a. C.; el vinagre se producía desde antes de esa fecha y finalmente el pan se conoce desde 4,000 a. C. aproximadamente. El yogur tiene su origen en Mesopotamia desde 5,000 años a. C; la palabra es de origen turco y su correcta escritura es *YOGUR*, que es el resultado de la fermentación de la leche. Los nómadas que después se instalarían en lo que el día de hoy es Bulgaria, lo introdujeron en Europa, ya en nuestra era. (Holzapfel, 2002). Pero esta parte del mundo es también el origen de otro producto lácteo fermentado llamado *kefir*. La historia del *kefir* es muy antigua, es mencionado en el Corán y es muy bien conocido en Europa oriental. Como el yogur, el *kefir* es una leche fermentada (Adawi, 2001).

Históricamente se han reconocido las propiedades benéficas de suplementos alimenticios microbianos "vivos", tales como leches fermentadas, desde hace muchos siglos. Su uso en el tratamiento de molestias del cuerpo ha sido mencionado en textos bíblicos; de hecho, la habilidad de las bacterias benéficas de transformar leche en productos de mayor atractivo alimenticio fue grabada hace 6,000 años, en tablas sumerias describiendo la fabricación del queso. Científicos

conocidos en épocas tempranas, como Hipócrates y otros, consideraron la leche fermentada no sólo como un producto alimenticio sino también como una medicina. Ellos prescribieron leche ácida para curar desórdenes estomacales e intestinales (Lourenss-Hattingh, 2001).

En 1857, las bacterias lácticas fueron descubiertas por Louis Pasteur; en 1878 Lister reportó el aislamiento de bacterias a partir de leche ácida; en 1889 Henry Tissier descubrió especies de *Bifidobacterium* (Adawi, 2001).

En 1908, el biólogo ruso, investigador del Instituto Pasteur, Elie Metchnikoff, (1845-1916), ganador del premio Nóbel en 1903 por su teoría de los fagocitos, fue el primero en dar una explicación científica de los efectos benéficos de las bacterias acidolácticas presentes en la leche fermentada, al observar que Bulgaria tenía un número increíble de personas que vivían más de 100 años.

Este país balcánico no era uno de los países avanzados de Europa y simplemente había surgido de ser una región mal administrada del Imperio Turco. Intuyendo que la medicina moderna no era motivo de la longevidad avanzada, Metchnikoff encontró que los búlgaros se alimentaban de grandes cantidades de verduras cultivadas en forma casera y mucho yogur. Las verduras no parecían ser un factor probable de longevidad, así que atribuyó la buena salud y longevidad de los búlgaros al consumo de una gran cantidad de leche fermentada, llamada *yogur*. Sugirió que el proceso de envejecimiento es el resultado de la intoxicación putrefactiva crónica ocasionada por la flora intestinal, esto, basado en sus observaciones de habitantes en algunas regiones de Bulgaria quienes consumieron yogur como parte de su dieta normal y que tuvieron una longevidad notoria (Hansen, 2002).

Metchnikoff propuso que la vida se prolongaba como consecuencia del consumo de las bacterias lácticas del yogur (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) sugiriendo así la teoría de que las bacterias nocivas en el intestino pueden ser eliminadas por la acción de estas bacterias (Hansen, 2002).

El principio de esta idea es que las bacterias acidolácticas ocasionan el desplazamiento de bacterias productoras de toxinas, normalmente presentes en el intestino, gracias a lo cual se prolonga la vida. Metchnikoff explicó que debido al ácido láctico y otros productos metabólicos de las bacterias acidolácticas en la leche ácida, se inhibe el crecimiento y la toxicidad de bacterias anaeróbicas formadoras de esporas en el intestino.

Metchnikoff observó que entre los microorganismos intestinales los hay perjudiciales y benéficos para la salud humana; él consideró la sustitución de los microbios intestinales por bacterias de yogur, que son benéficas. Esta teoría llamó la atención en aquellos días y popularizó el consumo diario de yogur entre los europeos de esa época.

Metchnikoff demostró la habilidad de los lactobacilos para transformar lactosa en ácido láctico, y también comprobó que dicha acidez constituye un ambiente hostil para las bacterias patógenas; muchos organismos peligrosos, causantes de enfermedades no se desarrollan o mueren en leche que contiene lactobacilos.

En la misma época, el microbiólogo francés, Tissier (Instituto Pasteur de Francia) observó que la microbiota fecal de recién nacidos alimentados con leche materna presentaba más *Bifidobacterium* que la microbiota fecal de niños que habían recibido leche no-materna, y reconoció el papel benéfico de esa bacteria; aisló *Bifidobacterium* de heces de infantes alimentados con leche materna y encontró que esta bacteria era un componente predominante de la flora intestinal en humanos. Tissier recomendó la administración de bifidobacterias para infantes que sufrían de diarrea, creyendo que las bifidobacterias podrían desplazar a las bacterias de putrefacción, responsables de los trastornos gástricos, y establecerse finalmente como microorganismos intestinales dominantes (Hansen, 2002).

En 1921 Rettger y sus colaboradores (Adawi, 2001), demostraron que las bacterias lácticas del yogur, en las cuales Metchnikoff basó su hipótesis, no son capaces de sobrevivir en el aparato digestivo.

Años después, en 1930 el Doctor Minoru Shirota (Adawi, 2001) aisló lactobacilos a partir del intestino humano, y tras varias investigaciones y selecciones logró fortalecerlos y obtener cepas resistentes a los jugos gástricos y a las sales biliares. El trabajo de Metchnikoff fue la primera prueba de la capacidad de los lactobacilos para transformar lactosa en ácido láctico, y probó también que dicha acidez mantiene un ambiente hostil para las bacterias patógenas. Esta teoría se ha comprobado frente a muchos organismos peligrosos generadores de enfermedades, que no se desarrollan o mueren en leche que contiene lactobacilos.

Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto de que la dieta puede proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y, en consecuencia, mejorar y prolongar la calidad de vida. Fue la primera persona en desarrollar un preparado terapéutico utilizando lactobacilos en forma de cápsulas para ingerir oralmente denominado Lactobacillin (Rastall, 2002).

Aunque fue probablemente Vergio hacia 1954, quien introdujo primero el término "probiótico", cuando comparó en su manuscrito "*Anti-und Probiotika*" el efecto perjudicial de los antibióticos y otras sustancias antimicrobiales, sobre la población microbiana intestinal, con factores favorables a la microflora intestinal ("Probiotika") (Cummings, 2001; Kaur, 2002). Fueron Lilly y Stillwell en 1965, quienes utilizaron por primera vez el término "probiótico" para describir sustancias producidas por un microorganismo, que estimularon el crecimiento de otros microorganismos (Holzapfel, 2002). Esta palabra se deriva de dos vocablos, del latín *-pro-* que significa por o a favor de, y del griego *-bios-* que quiere decir vida, a favor de la vida. La idea, cuya etimología parecía adecuada, no era, sin embargo totalmente correcta: estrictamente hablando, todas las sustancias de carácter nutritivo, por ejemplo, son probióticos, y no sólo determinados microorganismos (Fuller, 1991).

La definición de probióticos ha cambiado gradualmente con el entendimiento de los mecanismos por los cuales influyen en la salud humana. Ha tenido muchas definiciones en el pasado; algunas generales como: *“sustancias producidas por protozoarios que estimulan el crecimiento de otros”* o *“sustancias y organismos que tienen un efecto benéfico en el hospedero animal por contribuir al balance microbial intestinal”* han sido usadas en el pasado, pero no fueron satisfactorias (Kaur, I, 2002).

La definición más común actualmente usada es la de Fuller (1989): *Los probióticos son suplementos alimenticios microbiales vivos, que afectan benéficamente al animal hospedero mejorando su balance microbial intestinal.* La definición de probióticos ha sido desde entonces difundida, con énfasis en la importancia de células vivas como un factor esencial para el efecto probiótico. Havenaar y Huis in't Veld (1992) han ampliado la definición para incluir el uso de alimentos y no alimentos, y el uso de mezclas de cultivos.

Esta definición fue modificada y se redefinió el término de probióticos como: microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal.

Recientemente, un grupo de expertos europeos propuso una definición que también incluyó mecanismos no mediados por cambios de la microflora.

Actualmente hay un acuerdo general que indica que un “probiótico” se refiere a microorganismos viables que promueven o apoyan un balance benéfico de la población microbial nativa del tracto gastrointestinal. Tales microorganismos no pueden necesariamente ser habitantes constantes del tracto gastrointestinal, pero deben tener un efecto benéfico en el estado general y de salud de hombres y animales, de acuerdo con la definición dada por el organismo competente de la Unión , Europea (ILSI, International Life Science Institute, Bruselas 1998).

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, estimulan funciones protectoras en el tracto digestivo. Afectan benéficamente a una o varias funciones del organismo: Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y / o reducen el riesgo de enfermedad; pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma. También son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos, en el sentido de que se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Aso, 1995).

En los últimos años, los esfuerzos han sido enfocados a entender la compleja interacción entre el hospedero y su microbiota nativa. Sin embargo, es sólo hasta años recientes que la interrelación entre microorganismos intestinales y los beneficios a la salud derivados de éstos se están entendiendo. En la actualidad, se reconoce generalmente que un óptimo balance en la población microbiana del tracto digestivo está asociado con buena nutrición y salud.

Durante las pasadas dos décadas, los microorganismos probióticos (promotores de la salud) han sido incluidos con mayor frecuencia cada vez, en varios tipos de productos alimenticios, especialmente en leches fermentadas.

En el proceso de selección de microorganismos probióticos, deben considerarse varios aspectos, incluyendo seguridad, características tecnológicas y funcionales. Deben ser seleccionados para sobrevivir al tránsito gastrointestinal y llegar viables y capaces de contribuir positivamente a la actividad de la microbiota intestinal, y por lo tanto a la salud del hospedero (Saarela, 2002).

CAPÍTULO IV

*“EL TRACTO GASTRO-
INTESTINAL”*

EL TRACTO GASTRO-INTESTINAL

Para entender la función y contribución de los microorganismos probióticos en la salud y bienestar del hospedero, se requiere conocer la ecología de su tracto gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal empieza en la boca y finaliza en el ano, es la gran entrada tanto para la salud como para la enfermedad.

1. LA MICROFLORA INTESTINAL ANTES DEL NACIMIENTO

Durante todo su desarrollo, hasta antes del nacimiento, el tracto gastrointestinal del feto permanece estéril. A partir del nacimiento, se inicia la colonización microbiana del tracto gastrointestinal con extremada rapidez desde las primeras horas de vida, alcanzando cifras próximas a los 10^{10} microorganismos por gramo de heces a partir de las 48 horas del nacimiento (Collins, 1998; Kaur, 2002), creándose un ecosistema complejo (Adawi, 2001; Saarela, 2002).

Efectivamente, el sistema gastrointestinal de los mamíferos, incluyendo al hombre, está libre de microorganismos al nacer, y el desarrollo de flora bacteriana intestinal característica, es adquirida en un proceso gradual (Kirjavainen, 2001), que es determinado por diversos factores.

2. FACTORES QUE DETERMINAN LA INSTALACIÓN DE LA ECOLOGÍA MICROBIANA INTESTINAL

Desde luego, el tipo de nacimiento y el tipo de alimentación son los primeros factores que influyen en la composición de la flora microbiana:

2.1 EFECTO DEL TIPO DE NACIMIENTO

- a) En los mamíferos nacidos por parto natural, la colonización se inicia en el proceso del nacimiento, con la exposición al entorno del sistema

reproductor materno, cuyo trayecto de salida está densamente poblado por bacilos y cocos lácticos, principalmente.

- b) Cuando el nacimiento es mediante cirugía, la colonización se inicia de manera diferente, ya que no hay exposición a la flora del sistema reproductor materno; en este caso, los primeros microorganismos que se establecen son los del ambiente del lugar del nacimiento.
- c) La evolución de la colonización bacteriana en el intestino del neonato prematuro es diferente a la del intestino saludable del neonato maduro. En el caso de los humanos, los infantes prematuros requieren cuidados intensivos y adquieren lentamente organismos intestinales, por lo que la colonización se retrasa y tiene un número limitado de especies bacteriales, lo que los hace más susceptible a los virus. Se ha observado que la colonización aberrante de los infantes prematuros puede contribuir al desarrollo de enterocolitis necrótica (Kaur, 2002).

2.2 EFECTO DE LA DIETA

La dieta tiene un mayor efecto en la composición de la microflora intestinal, tanto por la flora presente en el alimento como por los nutrientes que aporta también para la flora. Se ha encontrado que hay diferencia significativa entre la microflora intestinal de mamíferos alimentados con leche materna y la que desarrollan aquellos alimentados con fórmula.

- a) En el intestino de mamíferos alimentados con leche materna, existe un predominio natural de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y una disminución en la proporción de coliformes. Es común que el contenido de *Bifidobacterium* sea de 10^{10} a 10^{11} ufc/g de heces, en infantes alimentados con leche materna, cantidad que representa el 25% de las bacterias intestinales. Lactococcus, enterococcus y coliformes representan menos del 1% de la población intestinal y normalmente están ausentes *Bacteroides*, *Clostridia* y otros organismos (Lourenss-Hattingh, 2001).

- b) Durante la alimentación con leche de fórmula, en los mamíferos hay un aumento en la colonización por anaerobios; se desarrolla una microbiota que es más compleja y similar a la de los adultos, conteniendo *Bifidobacterium*, enterobacterias, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridia* y *Enterococcus*. Los *Lactobacillus* aparecen ante la desaparición de *Bifidobacterium* (Saarela, 2002).

Es bien conocido que los infantes alimentados con leche materna tienden a sufrir de menos infecciones bacterianas que los infantes alimentados con fórmula (Rastall, 2002).

Los infantes alimentados con leche de fórmula tienen normalmente un contenido de un logaritmo menos de bifidobacterias (10^9 a 10^{10} /g) presentes en muestras fecales que los infantes alimentados con leche materna (Lourenss-Hattingh, 2001) y hay una tendencia para los bebés alimentados con fórmula, a tener altos niveles de enterobacterias, *Streptococcus* y otras bacterias saprofiticas.

No es sorprendente encontrar que la población bacteriana en el intestino de los vegetarianos es muy diferente a la de aquellos que integran productos cárnicos a su dieta.

3. LA FLORA INTESTINAL DESPUÉS DEL NACIMIENTO

Como ya se mencionó, el desarrollo de la flora intestinal se inicia en el momento del nacimiento y después continúa un proceso lento y gradual que se completa en varios años.

Los primeros gérmenes que inician la colonización son las enterobacterias y los enterococos; después de 12 horas del nacimiento estos microorganismos llegan a sus niveles máximos, al igual que los lactobacilos.

Hasta el segundo día de vida aparecen las bifidobacterias. Aún cuando se presentan tardíamente, alcanzan niveles altos que concuerdan con un descenso de los enterococos y de los coliformes, que son bacterias potencialmente patógenas.

En la etapa de la infancia, las cepas bacteriales más comunes son anaerobios facultativos tales como enterobacterias, coliformes y lactobacilos.

Las bifidobacteria están entre las bacterias anaeróbicas predominantes en la microbiota intestinal desde la temprana infancia hasta la edad adulta. Sin embargo, el número de bifidobacterias decrece a través de la edad y la composición de especies y cepas cambia de la infancia a la madurez y a la vejez (Saarela, 2002). Los lactobacilos se mantienen estables durante toda la vida del individuo e incluso incrementan su número durante la edad senil.

4. FACTORES QUE MODIFICAN LA FLORA GASTROINTESTINAL

La composición de la microflora después del nacimiento y a lo largo de toda la vida, está determinada por factores como (Kaur, 2002; Saarela, 2003):

- a) Ambiente
- b) Higiene
- c) Consumo de antibióticos, que disminuyen la incidencia de enfermedad y la muerte debido a infecciones, pero alteran el balance de la flora intestinal, (o de otros medicamentos).
- d) Cambios fisiológicos en la secreción biliar
- e) Enfermedades que alteran los movimientos peristálticos
- f) Estrés
- g) Colonización por patógenos
- h) Consumo de comidas contaminadas con sustancias químicas como conservadores, plaguicidas, etc.
- i) Contaminación bacteriológica
- j) Cambios en la dieta
- k) El proceso normal de envejecimiento, que altera drásticamente el ambiente intestinal produciendo una pérdida de bacterias benéficas y causando graves problemas digestivos que se manifiestan en diarrea, constipación, flatulencias e indigestión (Collins, 1998).

Otros factores que modifican la flora intestinal son (Elmer, 2001):

- l) Presencia de neoplasias intestinales
- m) Condiciones posquirúrgicas
- n) Enfermedades hepáticas y renales
- o) Radioterapia
- p) Inmunopatías
- q) Anemia perniciosa

5. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA GASTROINTESTINAL

El sistema gastrointestinal, cuyo largo es de aproximadamente 8 metros, es la puerta de ingreso para nuestra provisión de energía y de otros nutrientes que requerimos, es la zona de transformación inicial de dichos compuestos y es también la ruta de salida de los desechos.

En términos de microflora, es un órgano importante del hospedero, que constituye el hábitat de dicha microflora. Aunque histológica y fisiológicamente es bastante conocido, como ecosistema, el tracto gastrointestinal es relativamente inexplorado. Constituye un micro ecosistema dinámico, de una alta complejidad (Adawi, 2001). En el adulto humano promedio, la mucosa del tracto gastrointestinal tiene una superficie superior a los 300m², debido a los dobleces y pliegues del epitelio, a las vellosidades intestinales y a la formación de microvellosidades en los enterocitos receptores de la membrana luminal, lo cual hace de esta mucosa la mayor área del cuerpo humano que interactúa con el ambiente (Apostolow, 2001).

La superficie mucosal provee una gran área para la adhesión de microorganismos y, por lo tanto, para la colonización del intestino, con lo cual la microflora establecida participa de manera importante en el contacto entre el hospedero y el medio, y constituye una barrera contra componentes perjudiciales de la dieta y contra bacterias patógenas.

El ácido gástrico y el flujo peristáltico normal del intestino delgado limitan la población bacteriana de la parte alta del tracto gastrointestinal ayudando a

controlar la colonización. El intestino delgado es una zona de transición entre el estómago y el colon, en el se produce una transición gradual de la flora de Gram + a una población de Gram -. Esta flora varía según el segmento intestinal, por si misma no produce alteraciones.

Aún cuando las bacterias están distribuidas a lo largo del intestino, la mayor concentración de microorganismos y actividad metabólica se da en el intestino grueso. La primera sección del tracto (estómago, duodeno y yeyuno) tiene una microbiota superior a 10^5 UFC/ml de contenido. Del íleon en adelante, la concentración bacterial incrementa gradualmente hasta alcanzar 10^{10} a 10^{11} UFC/g en el colon. La gran área superficial sugiere una gran capacidad de área de absorción efectiva.

Se estima que hay aproximadamente 10^{10} células productoras de inmunoglobulinas por metro cuadrado de intestino delgado lo que representa aproximadamente el 80 % de todas las células productoras de inmunoglobulinas en el cuerpo humano (Collin, 1998).

En promedio, el tracto gastrointestinal de un humano adulto está colonizado por aproximadamente 10^{14} células microbianas (aproximadamente diez veces más que el total de células que cubren el cuerpo humano), (Puupponem-Pimiä, 2002).

En condiciones normales, en un adulto promedio existe una gran variedad de microorganismos que colonizan la última parte del intestino delgado y el grueso, constituyendo la flora intestinal del ser humano. Aunque los microorganismos están presentes a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, la población del intestino grueso es mayor (Puupponem, 2002).

Entre más de 400 cepas de distintas bacterias pertenecientes a más de 200 especies diferentes con un peso aproximado de 1,600 gramos, presentes en el intestino del ser humano adulto, se tiene una actividad metabólica global similar a la de un hígado. Dentro de esta flora se incluyen diversos géneros de bacterias, de los cuales, los Gram- positivos, anaeróbicos de los géneros *Bacteroides*,

Eubacterium, y *Bifidobacterium* predominan en el densamente poblado intestino grueso (Silvi, 2002).

Aunque la flora fecal parece un buen indicador cualitativo de la microflora del colon, no refleja la flora intestinal total, y ciertamente tampoco la flora del intestino delgado, ya que la diversidad de la población es muy notable entre uno y otro los segmentos del intestino, seguramente en función de las diferentes condiciones ambientales.

6. EFECTOS DE LA FLORA INTESTINAL EN EL HOSPEDERO

Las bacterias que llegan al tracto digestivo prosperan porque son capaces de adherirse a la pared intestinal y de usar los alimentos semi-digeridos que están pasando a través del intestino.

Las reacciones microbianas en el intestino tienen un papel esencial no sólo en la salud del intestino, sino en la salud del hospedero en general.

La microflora, como primera medida, incorpora un componente competitivo en el ambiente gastrointestinal del hospedero, con posibilidad de defensa a través de exclusión competitiva. Es también esencial para la educación inmune de la mucosa intestinal.

El potencial metabólico, debido al número de microorganismos existentes, sugiere fuertes efectos regulatorios en las funciones del cuerpo, especialmente en el colon, donde existe la más grande concentración de microorganismos (Puupponem-Pimiä, 2002).

De entre los centenares de especies que habitan el tracto gastrointestinal, son tres la de mayor interés por sus efectos en el hospedero:

- *Lactobacillus acidophilus* que fermenta los azúcares hasta ácido láctico, acidificando el medio; son capaces de vivir en pH's relativamente bajos, pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito

intestinal. Además, por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedero. Serían los eficaces guardianes de nuestro intestino delgado.

- Las bifidobacterias, bacilos que ocupan el tercer lugar dentro de las bacterias más numerosas en el tracto gastrointestinal de mamíferos; de modo aun más eficaz que las anteriores, producen diversas vitaminas del complejo B y son unas magnificas protectoras de nuestro intestino grueso. Son responsables de la producción de ácidos grasos de cadena corta y de ácido láctico, a partir de la fermentación de los carbohidratos, por lo que disminuyen el pH en el colon y crean un medio donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer ni desarrollarse. También producen las llamadas bacteriocinas, que actúan como antibióticos e inhiben a las bacterias patógenas. Además estimulan el sistema inmune, especialmente el intestinal.
- *Lactobacillus bulgaricus* suelen ser bacterias viajeras, transitorias que ayudan a las anteriores durante su paso por el tracto gastrointestinal.

Un epitelio intestinal sano en asociación con una flora intestinal óptima, provee de una barrera vital contra la invasión de microorganismos patógenos, antígenos y componentes dañinos para el lumen intestinal. La flora intestinal es esencial para la estimulación inmune de la mucosa intestinal.

Existen evidencias científicas que apoyan el concepto de que el mantenimiento de una microflora intestinal sana, da protección contra desórdenes gastrointestinales incluyendo infecciones, diarreas, enfermedades inflamatorias estomacales y también cáncer. La flora intestinal saludable puede también dar beneficios funcionales inmunológicos o prevenir enfermedades atópicas (Puupponem-Pimiä, 2002).

La mayor parte de los autores aceptan que la flora intestinal influye directa e indirectamente en el estado de salud del hombre y de los animales a través de las siguientes funciones (Gopal, 2001; Silvi, 2002).

- a) Funciones de barrera/ restauración
- b) Estimulación del sistema inmune
- c) Mantenimiento de la nutrición y circulación de la mucosa
- d) Absorción de nutrientes /incremento de biodisponibilidad
- e) Reabsorción de metabolitos bacterianos
- f) Estimulación de la motilidad del estómago
- g) Producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta
- h) Degradación de sustancias alimenticias no digeridas
- i) Protección a la integridad del epitelio intestinal
- j) Protección frente a microorganismos enteropatógenos.

El aumento de la población bacteriana incrementa la producción de vitamina B₆ potenciando y fortaleciendo el sistema inmunológico. Al mismo tiempo minimizan la proliferación de agentes patógenos peligrosos responsables de graves enfermedades que pueden llegar a la muerte, compitiendo por alojamiento y espacio físico en las paredes intestinales.

La presencia de lactobacilos y bifidobacterias, genera la formación de ácido láctico que da lugar a un ambiente hostil y desfavorable para el crecimiento de anaerobios y coliformes.

El desarrollo de una flora intestinal equilibrada es de primordial importancia, ya que determina parcial, pero significativamente, el bienestar general y la salud del huésped.

Muchos de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal son benéficos para nuestro organismo y aunque otros podrían ser perjudiciales,

conviven en la luz intestinal en equilibrio entre ellos. Si por algún motivo este equilibrio se rompe, se pueden producir diversos trastornos intestinales. Por este motivo, es importante mantener las funciones de las bacterias benéficas del intestino (Chiva, 2002; Sullivan, 2001).

La atención hacia la flora natural nativa y la atención especial para mantener la flora intestinal, son parte de las recientes tendencias enfocadas al bienestar general y las condiciones saludables de vida, en las que la alimentación sana y bien equilibrada ocupa un lugar central.

La comprensión de la importancia de la microbiota intestinal humana en la restauración y mantenimiento de la salud ha despertado el interés en el uso de los probióticos (Kaur, 2002).

CAPÍTULO V

*“CARACTERÍSTICAS DE LOS
MICROORGANISMOS
PROBIÓTICOS”*

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

Con el creciente interés comercial por el uso de alimentos funcionales conteniendo microorganismos probióticos, tanto en el campo de alimentos para animales, como en el de alimentos humanos, se observa un crecimiento paralelo en el estudio del papel de estos microorganismos en el tracto digestivo.

Se han establecido algunas características para seleccionar a los microorganismos con actividad probiótica, que no representen daños al que los ingiere.

Muchas especies diferentes han sido propuestas como candidatos a probióticos, de los cuales se han reportado una gran variedad de beneficios a la salud (Mac Farland, 2000). Las especies microbianas candidatas son apreciadas por ejercer efectos benéficos a la salud del hospedero, cambiando la composición de la microbiota intestinal, sin embargo, es importante que las bacterias administradas, lleguen viables y se establezcan en el intestino grueso (Kaur, 2002).

Se requiere un estricto criterio de selección para la identificación de cepas probióticas potenciales. Esencialmente, se sugiere que las cepas seleccionadas deben ser seguras, viables y metabólicamente activas dentro del tracto gastrointestinal para ejercer un efecto benéfico en el hospedero (Prasad, 1999).

Las características de los probióticos en alimentos fueron descritas por primera vez en 1999 por un grupo de trabajo de expertos en Berlín. De acuerdo a las conclusiones y definiciones del grupo de trabajo, los cultivos probióticos para uso en alimentos deben ser :

- a) Bien definidos y correctamente nombrados de acuerdo al sistema taxonómico validado.

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

- b) Permanecer disponibles y en estado viable en suficiente cantidad en el producto alimenticio durante todo el periodo de vida de anaquel.
- c) Ser capaces de alcanzar el sitio de acción en el intestino del hospedero, en un estado viable y en suficiente cantidad para multiplicarse por algún tiempo (días).
- d) Ser capaces de inducir efectos benéficos en el mantenimiento de la salud del hospedero.

En general, deben ser genéticamente estables y no dañar la salud del consumidor ni al ambiente en ninguna forma (Reuter, 2002).

En reportes posteriores realizados por Puupponem-Pimiä y colaboradores (2002), se incluyen además aspectos como: seguridad, características funcionales y tecnológicas.

- a) Los aspectos de seguridad se enfocan a especificaciones tales como origen (tracto gastrointestinal humano) y no patogenicidad.
- b) Los aspectos funcionales incluyen viabilidad y persistencia en el tracto gastrointestinal, inmuno-modulación, propiedades anti-mutagénicas y antagónicas.
- c) Los aspectos tecnológicos incluyen propiedades de crecimiento *in vitro* y durante el procesado, sobrevivencia y viabilidad durante el transporte y almacenamiento.

1. ASPECTOS DE SEGURIDAD

La principal característica con la que deben cumplir los microorganismos considerados para usarse como probióticos es la seguridad. Los microorganismos probióticos no deben representar ningún riesgo para el consumidor.

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

1.1 ORIGEN.

Se ha sugerido que los microorganismos con mejores características probióticas, son los tomados directamente de la flora nativa comensal del consumidor. Lo anterior debido al hecho de que un microorganismo tomado de este ambiente, ya se encuentra adaptado a las condiciones que encontrará en el sitio donde se espera que actúe.

Collin y colaboradores (1998) refieren que las bacterias probióticas destinadas a uso humano, preferiblemente, deben ser cepas de origen humano. Lo anterior se basa en la observación de que sólo las cepas humanas pueden ser adhesivas y colonizar el tracto gastrointestinal humano, lo cual es el primer paso de la promoción de la "colonización resistente". Concluyen además con la propuesta de la especificidad de las especies, indicando que para ser benéficas a un hospedero particular, debe ser aislado de esa especie. Se argumenta lo mencionado previamente, que una cepa probiótica puede funcionar mejor en un ambiente similar -por ejemplo tracto intestinal humano- a aquel del cual fue aislada originalmente.

La importancia de microorganismos probióticos originarios de la especie en la cual son usados ha sido debatida recientemente, considerando que no todas las cepas actualmente exitosas forman parte de la flora comensal del consumidor (Ahola, 2002).

1.2 NO PATOGENICIDAD.

Una de las más importantes características para un probiótico es que no sea patógeno y, por lo tanto, debe poseer estatus GRAS (Generally Regarded As Safe) (Bernardeau, 2002). Las cepas probióticas deben ser toleradas por el sistema inmune y no deben provocar la formación de anticuerpos.

El establecer el título de "microorganismo probiótico", sin una previa historia de uso seguro, ha sido un punto controversial en años recientes. Para garantizar la

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

seguridad de cepas probióticas, Salminen y colaboradores (1999), recomiendan lo siguiente:

- a) Caracterización del género, especie y cepa, y el origen de ésta ya que permite presumir seguridad en relación a otras cepas probióticas conocidas.
- b) Estudios de las propiedades intrínsecas de cada cepa específica y sus potenciales factores de virulencia.
- c) Estudios en adherencia, potencial de invasión y la farmacocinética de la cepa, y
- d) Estudios de interacciones entre la cepa, microflora intestinal y mucosal, y el hospedero.

Aspectos de seguridad incluyen las siguientes especificaciones:

- a) Tener una historia de no patogenicidad
- b) No tener historia de asociación con enfermedades tales como endocarditis infectiva o desórdenes gastrointestinales
- c) No acarrear genes transmisibles de resistencia a antibióticos.

2 ASPECTOS FUNCIONALES.

Se espera que los productos probióticos tengan determinadas características que les permitan actuar en favor del hospedero; deben considerarse las siguientes:

- a) Tolerancia al jugo gástrico.
- b) Tolerancia a sales biliares (una importante propiedad para sobrevivir en el estómago)
- c) Adherencia a la superficie epitelial y persistencia en el tracto gastrointestinal.
- d) Inmuno-estimulación, pero sin efecto pro-inflamatorio.

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

- e) Actividad antagónica contra patógenos tales como *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*.
- f) Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.

2.1 VIABILIDAD Y PERSISTENCIA EN EL TRACTO INTESTINAL.

Un importante criterio para seleccionar una cepa probiótica es su habilidad para alcanzar el sitio de acción en el tracto gastrointestinal del consumidor, sobreviviendo a las condiciones de acidez del estómago y a las concentraciones de sales biliares que encuentran a su paso; establecerse y ser capaces de funcionar en el ambiente intestinal (Puupponen-Pimiä, 2002).

2.1.1 TOLERANCIA A ÁCIDOS GÁSTRICOS.

Puesto que la administración oral es la más usual para introducir a los microorganismos probióticos, ya que se adicionan a alimentos, sobrevivir durante el tránsito gastrointestinal a través de las condiciones ácidas estomacales es muy importante.

El pH del estómago puede alcanzar valores tan bajos como 1.5, debido a la alta concentración de ácido clorhídrico secretado; representa la barrera primaria para los microorganismos que llegan al aparato digestivo. La sobrevivencia de las cepas probióticas durante el tránsito gástrico es también influenciado por las propiedades fisicoquímicas del alimento usado como vehículo. La capacidad amortiguadora y el pH del vehículo son factores significantes, desde la formulación del alimento con rangos de pH de 3.5 a 4.5 y una alta capacidad amortiguadora como las encontradas en productos como yogurt, quesos, y leche descremada, podrían incrementar el pH del tracto gástrico y por lo tanto aumentar la estabilidad de las cepas probióticas (Charalampopoulos, 2003).

2.1.2 TOLERANCIA A SALES BILIARES

La estabilidad a las sales biliares es una propiedad obligada para cualquier cepa que se espere que colonice el tracto intestinal. Dichas sales se encuentran en

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

concentraciones no menores al 0.5 % (p/v), lo cual representa una segunda barrera para los microorganismos en su camino hacia el tracto intestinal, en el caso de los probióticos, hacia el sitio de acción en el hospedero (Collin, 1998).

La sobrevivencia de los microorganismos en las diferentes partes del tracto gastrointestinal, varía entre cepas. Algunas son rápidamente inactivadas en el estómago, mientras otras, tales como cepas de *Bifidobacterium* o *L. acidophilus*, pueden pasar a través del tracto intestinal completo en altas concentraciones; esto es indispensable para que se consideren probióticos (Ahola, 2002).

2.2 ADHESIÓN A LA SUPERFICIE EPITELIAL Y PERSISTENCIA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Entre los criterios funcionales descritos para la selección de probióticos, algunos autores incluyen la adhesión en el colon, desde luego después de haber sobrevivido al tránsito por el tracto intestinal (Bodil, 2002).

La mucosa intestinal es un importante sitio para la adhesión y colonización bacterial. Existen distintas opiniones respecto a la necesidad de la adhesión de los microorganismos probióticos a las células, como requisito para ejercer funciones benéficas en el hospedero.

Apostolou y colaboradores (2001) consideran que la habilidad para adherirse a la mucosa intestinal es uno de los principales criterios de selección para probióticos potenciales, ya que permite al probiótico ejercer sus efectos para la salud. Aunque la adhesión es un factor potencial de virulencia en bacterias patógenas, este autor considera que los probióticos sólo pueden tener impacto en el hospedero cuando pueden adherirse a la mucosa intestinal y así mantener su presencia en el intestino.

Algunos autores, al considerar que la adherencia es un factor de virulencia en patógenos suponen que puede ser un potencial factor de riesgo. Alguna bacteria

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

viva que puede crecer bajo las condiciones encontradas en un hospedero puede, en principio, causar una infección (Ouwehand, 1999).

También se ha sugerido que los microorganismos probióticos que tienen la habilidad para agregarse con patógenos pueden ser más capaces de matar a estos organismos porque pueden producir sustancias antimicrobiales en una proximidad muy estrecha con ellos. Los probióticos no adhesivos, pueden aun afectar la adhesión de patógenos, y la composición y adhesión de la microflora intestinal, por ejemplo a través de la producción de metabolitos *in situ*, congregación, etc, por lo que influyen en la salud del hospedero (Ouwehand, 1999).

Desde el punto de vista la seguridad, la colonización del hospedero no debe persistir por periodos prolongados después de la ingesta. Sin embargo, los probióticos no parecen colonizar permanentemente al hospedero. En muchos casos, los probióticos administrados pueden ser detectados en las heces por días o pocas semanas después de interrumpir la ingesta, y desaparecen gradualmente, indicando la colonización pasajera (Ouwehand, 1999).

2.3 INMUNOESTIMULACIÓN.

La adhesión de cepas probióticas a las células epiteliales del intestino es un importante factor en el efecto inmunoestimulador, ya que se requiere de estrecho contacto con las células inmunológicamente activas del epitelio intestinal. Las habilidades de adherencia y colonización están estrechamente relacionadas con los efectos inmunológicos potenciales (Forestier, 2001).

2.4 ACTIVIDADES ANTAGÓNICAS CONTRA PATÓGENOS.

El tracto gastrointestinal constituye un ambiente complicado. La presencia o ausencia de determinados componentes de la flora nativa da especificidad a las condiciones que ahí se generan. El empleo de microorganismos probióticos está enfocado a establecer condiciones difíciles para los microorganismos patógenos.

Los microorganismos probióticos actúan de diferentes formas, generando condiciones no gratas a los patógenos (Lourenss-Hattingh, 2001):

- a) Su acción como antagonista competitivo por nutrientes y espacio, con los microorganismos patógenos.
- b) Producción de metabolitos como ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido butírico), peróxido de hidrógeno, bióxido de carbono y bacteriocinas antagónicas al crecimiento de patógenos.

2.5 PROPIEDADES ANTIMUTAGÉNICAS/ANTICARCINOGÉNICAS.

El cáncer es una de las más importantes causas de morbilidad y mortalidad en los países occidentales. Aunque no hay evidencia experimental directa para la supresión del cáncer en humanos, como resultado del consumo de cultivos ácido lácticos en productos lácteos fermentados y no fermentados, hay muchas evidencias indirectas, basadas en estudios de laboratorio generales. La actividad antimutagénica de células vivas o no vivas de diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacteria*, así como de los ácidos orgánicos usualmente producidos por estas bacterias probióticas, ha sido demostrado usando potentes químicos mutágenos y promutágenos en animales de laboratorio. Las bacterias vivas mostraron una alta actividad antimutagénica y su eficiencia en la inhibición de mutágenos fue mayor que la observada en células bacteriana muertas (Kaur, 2002). También se ha reportado la inhibición del cáncer de colon (Temmerman; 2002). El mecanismo preciso de acción, aun no es bien conocido, sin embargo, pueden presentarse una variedad de mecanismos, entre ellos: aumento de la respuesta inmune del hospedero, unión a y degradación de carcinógenos potenciales, alteraciones cuantitativas y/o cualitativas en la microflora intestinal. Otros efectos pueden incluir la alteración de actividades metabólicas de la microflora intestinal y la alteración de condiciones fisicoquímicas en el colon. Reddy reporta (en Kaur, 2002). que la administración en la dieta de cultivos liofilizados de *Bifidobacterium longum* suprimió fuertemente el desarrollo de tumores de colon y de mama.

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

En resumen, las propiedades anticarcinogénicas bacteriales pueden corresponder a uno o más de los siguientes tipos:

- unión y degradación de (pro)carcinógenos,
- producción de compuestos antimutagénicos,
- modulación de enzimas procarcinogénicas en el intestino, y
- supresión de tumores por un mecanismo de respuesta inmune.

Un gran número de bacterias y levaduras son capaces de unirse, *in vitro*, a mutágenos; además, células bacteriales no viables son capaces de unirse a mutágenos y carcinógenos. En humanos, pruebas con cepas probióticas han sido asociadas con la reducción de mutágenos fecales o actividad enzimática fecal involucrada en activación mutagénica o carcinogénica (Saarela, 2000).

3 ASPECTOS TECNOLÓGICOS.

Como ya se ha mencionado, se requiere de la presencia de los microorganismos probióticos en estado viable en el sitio de acción, para que éstos ejerzan los efectos benéficos en el hospedero, por lo que es indispensable que sobrevivan a una serie de procesos tanto en el alimento como en el tracto digestivo.

Primero, el probiótico debe resistir a los procesos industriales de manufactura del producto. Además, deben sobrevivir y conservar su funcionalidad durante el almacenamiento, y también dentro de los alimentos a los cuales están incorporados, sin alterarlos, por lo que deben tener buenas propiedades tecnológicas para que puedan incluirse en los productos alimenticios sin perder viabilidad o funcionalidad, y sin generar sabores o texturas desagradables (Puupponen, 2002).

3.1 RESISTENCIA AL PROCESO.

En la industria alimentaria actual, algunos alimentos son vehículos para la administración de probióticos, por lo que se debe cuidar mucho la conservación y estabilidad de éstos a lo largo del proceso de producción. Los probióticos son

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

incorporados a los alimentos en distintas fases del proceso, dependiendo de cada producto.

En estudios con alimentos sometidos a temperaturas altas, en los que se había detectado una disminución en el número de bacterias viables durante el estrés térmico y el secado por aspersion, se ha reportado un aumento en la viabilidad de los probióticos usados, cuando éstos son preadaptados a las temperaturas de proceso, comparado con un control no preadaptado (Colette, 2002).

La sobrevivencia de las cepas dependerá de factores tales como el pH del producto final, la presencia de otros microorganismos, la temperatura de almacenamiento y la presencia o ausencia de inhibidores microbianos en el sustrato (Collins, 1998). Por ello, retener la viabilidad y funcionalidad del probiótico a lo largo de todo el proceso y almacenamiento es uno de los mayores retos tecnológicos en la industria alimentaria actual, e incluye la conservación de estos atributos desde el manejo de los probióticos como materias primas, antes de la elaboración del producto, hasta el tiempo de vida de anaquel en el hogar del consumidor final.

En el manejo de las cepas probióticas como materias primas, la congelación y liofilización son las formas más comunes, pero también es muy importante la reproducción de las mismas en el producto final, por ejemplo en el yogur.

La sobrevivencia y contenido celular de bacterias probióticas varían dependiendo de la cepa y la manufactura. Para mantener la confianza en los productos probióticos es importante demostrar que se conserva la viabilidad y funcionalidad de las cepas durante la vida de anaquel. Lo que es más, un agradable sabor y textura son esenciales para todos los productos. Algunas cepas son mas sensibles al estrés ambiental por ejemplo bajo pH o concentración de oxígeno. Finalmente, también deben considerarse la estabilidad de las cepas y de sus características probióticas a lo largo de los años, para seguir ofreciendo un producto de calidad;

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

como seres vivos tienen el potencial de modificarse al cabo de varias generaciones, lo que debe evitarse (Saxelin, 1999). En este sentido el trabajo de los microbiólogos para conservar las cepas y verificar periódicamente sus características, es fundamental.

3.2 SOBREVIVENCIA Y VIABILIDAD DURANTE EL TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO.

Después de haber sobrevivido a las condiciones de proceso, es importante que la formulación mantenga la actividad y viabilidad de los probióticos por periodos prolongados durante la vida de anaquel del producto. No deben multiplicarse pues ello generaría la demanda de nutrientes, afectando la estabilidad probiótica y las características sensoriales del producto. Factores tales como actividad acuosa, tensión de oxígeno, temperatura y presencia de microorganismos competitivos e inhibidores llegan a ser cada vez más importantes cuando interactúan con los probióticos en este tipo de productos (Sandholm, 2002).

El almacenamiento a temperatura ambiente es común para diversos tipos de productos no lácteos tales como cereales, bebidas, chocolates, etc. (Puupponen-Pimia, 2002) y puede producir un cambio abrumador en la estabilidad de los probióticos. Este problema puede resolverse mediante la tecnología de encapsulación probiótica, para asegurar la viabilidad y estabilidad de los cultivos probióticos (Martensson, 2002).

Los materiales de empaque usados y las condiciones bajo las cuales los productos son almacenados, también son importantes para la calidad de los productos (Puupponen-Pimia, 2002).

Introducir un producto probiótico al mercado involucra el conocimiento y compromiso de que necesitan ser cuidadosamente controlados para obtener un producto correctamente etiquetado, funcional y seguro (Saarela, 2000). Si los productos no son correctamente etiquetados, la seguridad y funcionalidad no

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

puede ser garantizada debido a la falta de documentación de los componentes del producto.

Hamilton-Miller y colaboradores (1999), en un análisis microbiológico de producto lácteos probióticos, encontraron que la identidad y el número de especies recuperadas no siempre corresponde a la información declarada en la etiqueta del producto.

4 CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

Un probiótico potencial no necesita cumplir todos estos criterios de selección, pero se consideran en función del efecto esperado, la zona de acción y el producto en el que se utilizará. Además es necesario que exista evidencia en la literatura científica, de las siguientes cualidades (Ouwehand, 1999):

- a) Pruebas suficientes de sus propiedades benéficas para la salud
- b) La cepa debe ser capaz de "colonizar" el tracto gastrointestinal, de modo que desempeñe un papel dominante en el mantenimiento del equilibrio microbiano
- c) Actividad de antibiótico "natural", de modo que inhiba el crecimiento de los agentes patógenos que causan una enfermedad.
- d) Su consumo no debe entrañar riesgos para la salud
- e) Debe ser fácil de producir, de cara a su comercialización
- f) No debe tener efectos negativos sobre otros microorganismos benéficos del intestino.

Hasta la fecha sólo unas cuantas bacterias han cumplido todos los criterios citados y la mayor parte de ellos pertenece a la familia *Lactobacillus* (Worldfoodscience, 2001)

Las cepas de *Lactobacillus* son consideradas como seguras (GRAS) debido a su larga historia de uso seguro en alimentos fermentados y a su presencia en la microflora intestinal normal de humanos. Cuando nuevos probióticos potenciales

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

son usados, siempre deben ser considerados los aspectos de seguridad, por su importancia para determinar si las cepas tienen algún factor indicativo de virulencia (Apostolou, 2001).

En el mercado mundial de los alimentos funcionales, los componentes activos más típicos de los productos probióticos son las bacterias acidolácticas, de los géneros *Lactobacillus*, y *Enterococcus*, así como *Bifidobacterium*. Los reportes que relacionan a los probióticos con la salud son numerosos e incluyen mantenimiento de la flora intestinal sana y protección contra infecciones, alivio de intolerancia a la lactosa y estimulación del sistema inmune.

Bifidobacterium y *Lactobacillus*, típicamente habitantes del tracto gastrointestinal humano, son considerados benéficos y pueden ser estimulados por ingredientes alimenticios no digeribles, tales como oligosacáridos, colectivamente llamados prebióticos (Wilhelm, 2002).

Además de que resistan el proceso del alimento y el tránsito por el tracto gastrointestinal, de que se instalen en éste y sigan funcionando, los probióticos deben incorporarse en los alimentos sin producir sabores o texturas desagradables y mantenerse viables pero no en crecimiento. Los materiales de empaque usados y las condiciones bajo las cuales los productos son almacenados también son importantes en la calidad final (Bielecka, 2002).

Por el momento, las bacterias ácido lácticas (LAB) siguen siendo el grupo más interesante para seleccionar probióticos. Cabe recordar que habitan dos principales nichos ecológicos: la mucosa intestinal de hombres y animales, y los productos alimenticios fermentados. Varias especies de LAB son usadas comercialmente para la producción de lácteos y cárnicos fermentados y otros alimentos.

Lactobacillus spp son miembros prominentes de la flora comensal intestinal de la mayoría de los adultos sanos y son las bacterias probióticas más comúnmente estudiadas. Sus beneficios probables o teóricos han sido descritos en muchas revisiones recientes e incluyen la disminución de la intolerancia a la lactosa, alivio

CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

de algunas diarreas, reducción de los niveles de colesterol, incremento de la respuesta inmune y prevención de cáncer.

Las cepas de LAB son los mejores representantes de probióticos, tanto en el mercado de alimentos como en el farmacéutico.

5 Microorganismos usados como probióticos

Sólo se conoce un agente bioterapéutico no bacteriano: la levadura, *Saccharomyces boulardii*, antes denominada *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS 5926.

Cepas probióticas prometedoras incluyen los miembros del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*. Las especies representativas incluyen *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, y especies de *L. lactis*. En los últimos años han adquirido importancia como probióticos: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Ellos tienen considerable potencial para inclusiones futuras en alimentos funcionales y productos relacionados con la salud. Aunque esas afirmaciones son generalmente aceptadas por científicos y consumidores, el mecanismo molecular subyacente permanece controversial (D. Charalampopoulos, 2002; Laine, 2002; Sindhu, 2001).

Para el aumento de la eficacia de los probióticos, es necesario obtener conocimiento adicional en su modo de acción.

CAPÍTULO VI

“MECANISMOS DE ACCIÓN ”

MECANISMOS DE ACCIÓN

Se han propuesto muchos modelos que pretenden explicar la manera en que actúan los microorganismos probióticos ejerciendo efectos benéficos en los consumidores.

Después de la ingestión, los probióticos son confrontados por un número de barreras físicas y químicas tales como ácidos gástricos y biliares, como se explicó en el capítulo anterior. Como resultado, sólo una pequeña porción de esos microorganismos probióticos son capaces de pasar viables la parte alta del sistema gastrointestinal y de establecerse en el intestino.

Una vez que los probióticos se han establecido en el epitelio intestinal, deberán competir por nutrientes y sitios ecológicos de colonización (o nichos) con la microflora ya establecida y permanecer en este sitio, al menos temporalmente, produciendo metabolitos.

Los efectos reportados que se asocian con el mejoramiento de la salud durante la ingesta de probióticos son:

- a) Efectos antagónicos competitivos, por ejemplo competencia por sitios para adhesión y por nutrientes (Gibson, 1998; Penner, 2005).
- b) Producción de sustancias antimicrobianas inhibitorias tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Salminen, 1998; Penner, 2005).
- c) Estimulación del sistema inmune (Collins, 1998; Gill, 2001; Temmerman, 2002; Bomba, 2002; Penner, 2005; Commanche, 2005).
- d) Efectos nutricionales (Temmerman, 2002).
- e) Efectos de disminución de niveles de colesterol (Betoret, 2003; El-Gawad, 2005).

- f) Prevención de cáncer de colon y coadyuvante en la terapia del de cáncer (Temmerman, 2002; Matsumoto, 2004; Burns, 2004; Commanche, 2005).
- g) Promotores del crecimiento (Fuller, 1991; Salminen, 1998; Gibson, 1998; Collins & Gibson, 1999).

1. EFECTOS ANTAGÓNICOS COMPETITIVOS

Para tener un impacto en la flora del colon es importante que los microorganismos probióticos muestren actividad antagónica contra bacterias patogénicas (Saarela, 2000).

Los microorganismos probióticos pueden prevenir colonización intestinal de bacterias perjudiciales ejerciendo efectos de competencia por nutrientes esenciales o por sitios de adhesión (Saarela, 2000). La adhesión de los probióticos a la mucosa intestinal se considera un prerrequisito para ejercer efectos saludables, tales como la exclusión de patógenos (Laine, 2002). Las bacterias probióticas se unen a los enterocitos, inhibiendo la unión de patógenos entéricos a la mucosa intestinal. Esta competencia por los receptores específicos intestinales, es una forma de prevenir infecciones del hospedero (Albillos, 2002).

Algunas cepas probióticas se adhieren pobremente *in vitro* y/o *in vivo* y aún pueden mostrar efectos positivos en el hospedero. Al mismo tiempo minimizan la proliferación de agentes patógenos compitiendo por alojamiento o espacio físico en las paredes intestinales.

Los microorganismos probióticos ya presentes dentro del tracto intestinal, comienzan a competir por los nutrientes del medio, ejerciendo presión y limitaciones en el resto de los microorganismos presentes.

2. PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS.

La presencia de microorganismos probióticos adheridos en el intestino, involucra la constante generación de sus metabolitos en este sitio, dentro de los que destacan los metabolitos secundarios que son tóxicos para los microorganismos competidores, entre los que se encuentran los patógenos intestinales. La secreción de estas sustancias es uno de los constituyentes del "nicho ecológico" de los probióticos y actúan impidiendo la multiplicación de los competidores; cuando dichos competidores son patógenos intestinales, al limitar su reproducción se limita también la producción de toxinas y su acción patogénica mediante un ambiente hostil.

Dentro de los metabolitos generados por microorganismos probióticos se pueden encontrar:

- a) Ácidos orgánicos.
- b) Peróxido de hidrógeno.
- c) Bacteriocinas.

Este tipo de sustancias, que son metabolitos secundarios, tienen gran importancia ya que muestran inhibición de amplio espectro contra muchos organismos perjudiciales tales como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, y *Helicobacter* (Ouwehand, 1999; Saarela, 2000).

2.1 ACIDOS ORGÁNICOS.

La producción de ácidos grasos de cadena corta y de ácido láctico como productos de la fermentación de los carbohidratos por los microorganismos probióticos, disminuyen el pH en el colon, creando un medio donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse.

La producción de ácidos orgánicos, además de disminuir el pH, altera el potencial de óxido-reducción en el intestino, resultando en la acción antimicrobial. Combinado con el contenido limitado de oxígeno en el intestino, los ácidos

orgánicos inhiben especialmente bacterias Gram negativas patógenas por ejemplo, bacterias coliformes.

Los ácidos grasos de cadena corta poseen una mayor actividad bactericida que los ácidos no orgánicos tales como el ácido clorhídrico, y la actividad bactericida de los ácidos orgánicos depende principalmente de su forma disociada. Los ácidos orgánicos no disociados pueden permear a una membrana celular por difusión y liberar protones en la célula. La entrada de protones induce la acidificación del citoplasma y disipa el potencial protónico de la membrana (ΔpH). Esto permite alterar la fuerza protón motiva, e inhibe el mecanismo de transporte de los sustratos, interviniendo en los procesos de síntesis de energía y síntesis de macromoléculas por lo que la acumulación aniónica resulta en una toxicidad bacterial (Ogawa, 2001).

Los probióticos, incluyendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han mostrado tener un efecto inhibitorio contra el crecimiento de un amplio rango de patógenos intestinales. *Bifidobacterium* produce ácido láctico y ácido acético. El ácido acético ejerce un mayor efecto antagónico contra bacterias Gram-negativas que el ácido láctico. Ambos ácidos grasos de cadena corta (acético y láctico), metabolitos de bacterias acidolácticas, se reportan como responsables de la actividad antimicrobial contra *E. coli* en el intestino (Ogawa, 2001).

Cuando los microorganismos probióticos transforman lactosa en ácido láctico, éste funciona como un antiséptico del sistema digestivo y a su vez facilita la absorción del calcio y fósforo contenido en la leche (Bomba, 2002).

2.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Dentro de las sustancias inhibidoras generadas por microorganismos probióticos también se encuentran los metabolitos oxígeno-tóxicos. De éstos, la producción de peróxido de hidrógeno es de primera importancia ya que tiene un efecto bactericida en muchos patógenos (Kaur, 2002)

La presión oxidativa ocurre cuando altos niveles anormales de especies oxígeno reactivas (ROS por sus siglas en inglés) son generadas, resultando en el daño de DNA, proteínas y lípidos. En alguna microbiota humana, *Lactobacillus*, *Streptococcus spp*, originan un incremento del contenido de aniones súper óxido y peróxido de hidrógeno los cuales son altamente tóxicos para diversos microorganismos por lo que ejercen un impacto antagónico en la ecología intestinal (Kullisaar, 2002).

El efecto antimicrobial de *Lactobacillus spp*, está bien expresado vía ROS (peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidroxilo), los cuales pueden tener una influencia selectiva en la microbiota intestinal. Se ha demostrado que algunos *Lactobacilli* poseen actividad antioxidativa y son capaz de disminuir el riesgo de acumulación de ROS durante la ingestión de alimentos. Las bacterias acidolácticas son capaces de degradar el anion superóxido y el peróxido de hidrógeno (Kullisaar, 2002).

2.3 BACTERIOCINAS

Se sabe, desde hace tiempo, que muchos microorganismos probióticos producen bacteriocinas, las cuales actúan como antibióticos e inhiben a las bacterias patógenas. Su papel en la inhibición de patógenos *in vivo* puede ser limitado. Esto se atribuye a su naturaleza proteica, que hace que sean degradados por la digestión humana (Forestier, 2001), y a que las bacteriocinas presentan un efecto inhibitor sólo contra especies relacionadas estrechamente, tales como otros *Lactobacillus*, o contra esporulados como *Bacillus* o *Clostridium* (Saarela, 2000; Fooks, 2002). Algunas bacteriocinas tales como colicinas producidas por *Escherichia coli*, inhiben la síntesis de proteínas, actuando en el RNA.

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas (LAB) han sido ampliamente estudiadas debido a que muchas de éstas inhiben a bacterias patógenas. Las bacteriocinas producidas por LAB son un grupo relativamente

heterogéneo de pequeñas proteínas. Normalmente comparten un modo común de acción en su habilidad para formar poros en la membrana de la bacteria blanco, alterando así su contenido citoplasmático (Stanton, 2001; Hansen, 2002). Entre estas bacteriocinas destacan la reuterina, producida por *Lactobacillus reuteri* que tiene acción contra Grampositivos, Gramnegativos y algunos protozoarios; la lactocina y la acidolina, producidas por *Lactobacillus acidophilus* que tienen una moderada acción antibacteriana.

La habilidad de los microorganismos probióticos para producir diferentes compuestos antimicrobiales tales como bacteriocinas, es una de las características de exclusión competitiva, efectiva contra patógenos, muy útil para sobrevivir en el intestino y, por lo tanto, para expresar el efecto probiótico al hospedero (Forestier, 2001).

3. ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

El consumo regular de bacterias probióticas puede inducir una respuesta inmunológica en el hospedero. Mediante la inmunomodulación estos organismos protegen al huésped de las infecciones induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos que integran el sistema de defensa del organismo, encargado de poner en marcha una serie de mecanismos para hacer frente a la invasión masiva de sustancias extrañas ó antígenos (Gonzalez, 2001).

Las bacterias probióticas interactúan con las células de la mucosa incluyendo células epiteliales y células inmunes. Las células dendríticas pertenecen al grupo de células que presentan antígenos que inician la respuesta inmune local en la mucosa intestinal y juegan un papel inmunorregulatorio central en el balance de células auxiliares T: Th1, Th2 y Th3. Diferentes especies de *Lactobacillus* aportan diferentes estructuras a las células dendríticas (Marteau, 2002).

Se ha demostrado que *Lactobacillus* asociado a la mucosa puede ser potente estimulador de IL-12, y por lo tanto potencializa la inmunidad mediada por células, si logran pasar a través de la barrera epitelial del intestino e interactuar con las células del sistema inmune del intestino (Kullisaar, 2002).

Se ha observado también un incremento en la fagocitosis por leucocitos después del consumo de *L. rhamnosus* HN001, indicando que esta cepa de LAB es capaz de aumentar específicamente la función inmuno celular natural en humanos. (Gill, 2001). El hecho de que la estimulación inmune por *L. rhamnosus* HN001 sea restringida al periodo de consumo del probiótico, y de que la inmunidad retorne a los valores base cuando se suspende, indica que la inmunorregulación puede ser cuidadosamente controlada mediante el control de la ingesta dietaria (Gill, 2001; Kitazawa, 2002).

Recientes investigaciones han indicado que las LAB pueden potencialmente inducir la secreción de citocinas, incluyendo interferones y pro-interferones tales como interleucina-12 e IL.18; esas citocinas inmunorregulatorias estimulan la inmunidad mediada por células preferencialmente, y por lo tanto es posible aumentar la capacidad para la fagocitosis por dos distintos tipos de leucocitos.

Marteau (1996) demostró que la leche fermentada con *L. acidophilus* no alteraba las secreciones de inmunoglobulinas en el yeyuno, pero conducía a un incremento de las IgA séricas. Desde entonces, Schiffrin y colaboradores (1995) observaron un incremento en la actividad fagocítica de los leucocitos sanguíneos, en sujetos que habían ingerido una leche fermentada con *L. acidophilus* durante 3 semanas.

El consumo de cepas adhesivas *L. johnsonii* Lj1 y *B. lactis* Bb12 ha mostrado incrementar la fagocitosis de *E coli* "in vitro". Una combinación de ambas cepas con *S. thermophilus*, también ha mostrado actividad adyuvante cuando son consumidos en combinación con un atenuador de *Salmonella typhimurium*. La

preparación causó un incremento significativo en IgA sérica específica a la *Salmonella* (Collins et al 1998).

Experimental y clínicamente se ha demostrado que es posible la recolonización del tracto gastrointestinal con cepas apropiadas de microorganismos suministrados oralmente, y que dicha recolonización puede reestablecer la tolerancia y el subsecuente desarrollo de un fenotipo inmune balanceado. Esas observaciones indican dos importantes principios:

- Primero: que mientras la microflora intestinal es sin duda importante en soportar un funcional aun sistema inmune balanceado, el proceso que permite este balance puede ser estimulado por la colonización pasajera del tracto gastrointestinal con apropiadas cepas de microorganismos- mas comúnmente bacterias ácido lácticas Gram positivas (*Lactobacillus*), o bien con *Bifidobacterium*, ingeridos oralmente como probióticos.
- Segundo: que la función del sistema inmune, tanto a nivel sistémico como local del tracto gastrointestinal, puede ser influenciada por señales provenientes de esos nuevos colonizadores (Collins, 1998; Adawi, 2001; Albillos, 2002; Temmerman, 2002; Ali, 2005).

La adherencia de cepas probióticas que pasajeraamente colonizan el tracto intestinal, causa un incremento en los niveles de IgA, generando una mayor respuesta de IgA sérica frente a patógenos tales como *Salmonella typhi* Ty21a (Collins, 1998; Holzapfel, 2002).

Las células intestinales productoras de IgA están principalmente en los parches de Peyer. Para ejercer un efecto en el sistema inmune, un microorganismo probiótico debe activar las células linfoides del intestino, las cuales están distribuidas entre las células epiteliales y la submucosa. Los probióticos pueden afectar esas células a través de la interacción entre el tejido linfoide y los probióticos completos, sus fragmentos o metabolitos producidos *in situ* (Ouweland, 1999).

La mayor parte del secuestro de los antígenos por el intestino se realiza en los folículos asociados al epitelio y presentes en los parche de Peyer. Los folículos asociados al epitelio están formado por una monocapa de células epiteliales alternadas con células M. Aunque las células M son poco frecuentes, son adecuadas para jugar el papel principal en la inmunomodulación probiótica cuando la respuesta inmune es inducida por los propios microorganismos. Esto aplica principalmente cuando el hospedero tiene un intestino sano (Ouwehand, 1999).

Parece que muchos efectos probióticos son mediados a través de regulación inmune, y especialmente a través de control de balance de citocinas pro inflamatorias y antiinflamatorias, por lo que se sugiere el uso de probióticos como herramientas innovadoras para aliviar la inflamación intestinal, normalizar disfunciones mucosales intestinales, y regular hipersensibilidad. Todo parece indicar que la estimulación inmune por cepas probióticas está basada en colonización pasajera o a largo plazo, a través de la adhesión o agregación sin invasión (Wilhelm, 2002).

En un innovador estudio de investigación llevado a cabo "*in vitro*" (Prasad, 1998) se comparan los efectos inmunológicos de LAB y distintas enterobacterias sobre enterocitos humanos. Mientras que las enterobacterias son capaces de activar las células epiteliales del intestino por sí mismas, las LAB lo hacen mediante la inducción de la expresión de ciertos marcadores superficiales en las células epiteliales intestinales, haciéndolas más sensibles a la exposición simultanea de IFN-gama. Por otra parte, el mecanismo disparado por las enterobacterias da lugar a una respuesta inflamatoria local (con producción de IL-8, MCP-1, TNF-alfa y GM-CSF) que no ocurre con las LAB, característica interesante en relación con su papel protector de la mucosa intestinal. El efecto de las bifidobacterias en su paso por el intestino y los mecanismos por los que estimulan el sistema inmune también han sido estudiados, (Prasad, 1998) y se ha comprobado que el consumo regular de leche fermentada puede prevenir la infección, gracias a la acción de la IgA secretora que impide la absorción de antígenos por el epitelio de las mucosas,

así como su entrada al interior del organismo, y de ese modo se evita el anclaje de microbios patógenos al epitelio intestinal.

4. EFECTOS NUTRICIONALES

La presencia de microorganismos probióticos en el tracto gastrointestinal del hospedero, permite a éste la asimilación de micronutrientes de excreción por los probióticos, que durante su metabolismo los transforman, mejorando su biodisponibilidad para el hospedero (Prasad, 1999).

Algunos microorganismos tienen la habilidad de unirse a iones metálicos presentes en el ambiente externo; pueden unirlos a la superficie celular o acumularlos en la célula. Estas propiedades han sido explotadas también en preparaciones probióticas: las levaduras y lactobacilos son capaces de captar **selenio** del medio de crecimiento y concentrarlo al interior de la célula y ambos producen una forma orgánica, a partir de selenio inorgánico. Recientemente, levaduras y lactobacilos con selenio han sido comercializados como un suplemento de selenio el cual es mucho más biodisponible (Bomba, 2002).

El cromo trivalente es el constituyente activo del factor tolerancia de glucosa (GTF), el cual es necesario para potencializar la insulina. La levadura es capaz de producir GTP y por lo tanto sirve como un suplemento alimenticio de la forma no tóxica y bioactiva del cromo (Bomba, 2002).

Ciertas especies de *Lactobacillus* son capaces de concentrar altos niveles de **manganeso**, lo que permite que se utilicen como vehículos para suplementar este nutriente (Prasad, 1999).

En la elaboración de productos lácteos fermentados con microorganismos probióticos, se producen cambios en los macro y micronutrientes de la leche, se modifican su sabor y textura, así como la digestibilidad de los nutrientes. Por ejemplo, mejora la biodisponibilidad de la proteína y de la grasa de la leche. Por

esta razón, los lácteos fermentados constituyen una importante fuente de proteínas de alta calidad además de ser una excelente fuente de calcio, riboflavina, vitaminas A y D, magnesio y zinc, nutrientes que son de gran bio-utilidad. Por otro lado, el ácido láctico producido en la fermentación funciona como un antiséptico del sistema digestivo y facilita la absorción del calcio y fósforo de la leche (Prasad, 1999).

Los microorganismos probióticos incrementan la producción de vitaminas del complejo B lo cual también aporta al fortalecimiento del sistema inmunológico. Por ejemplo, el ácido fólico (o folato) no es abundante en la leche, pero se sintetizan cantidades significativas durante la fermentación. Además, en humanos el ácido fólico es producido por la microbiota en el intestino grueso y asimilado por el hospedero. Crittenden (2002) reporta un mecanismo de absorción luminal de ácido fólico por células del colon humano, lo cual sugiere que el folato producido *in situ* por la microbiota puede ser utilizado por células en el epitelio del colon.

5. EFECTOS DE DISMINUCIÓN DE NIVELES DE COLESTEROL

Hay evidencias de que el consumo de leche fermentada reduce significativamente el colesterol sérico. Por ejemplo, Bomba y colaboradores (2002) han reportado la influencia de los probióticos en los niveles de colesterol de la sangre por inhibición de la síntesis, o directamente porque lo asimilan. En individuos hipercolesterolémicos, la reducción significativa de niveles de colesterol en plasma está asociada con una reducción significativa en el riesgo de ataques cardíacos (Lourens-Hattingh, 2001).

El sitio principal del metabolismo del colesterol es el hígado, aunque se forman cantidades apreciables en el intestino. Se ha observado que ciertas cepas de *L. acidophilus* y algunas especies de *Bifidobacterium* son capaz de bajar los niveles de colesterol dentro del intestino. El colesterol coprecipita con sales biliares en pH's bajos, provocados por las bacterias acidolácticas (Lourenss-Hattingh, 2001).

Los cultivos de *Bifidobacterium* y *L. acidophilus* juegan un importante papel en la disminución del colesterol sérico, aunque el mecanismo no está claramente entendido. Una teoría es que *L. acidophilus* reconjuga los ácidos biliares en ácidos libres, los cuales son excretados más rápidamente del tracto intestinal que los ácidos biliares conjugados. Al ser excretadas sales biliares libres, la síntesis de nuevos ácidos biliares puede reducir la concentración de colesterol total en el cuerpo (Lourenss-Hattingh, 2001).

Kaur y colaboradores (2002) reportan un trabajo en el cual la administración de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 por 7 días a ratones hipercolesterolémicos, disminuyó el colesterol total a 38.7%.

6. SUPRESIÓN DE CÁNCER

El cáncer es una de las causas más importantes de mortalidad en países occidentales. Aunque no hay evidencia experimental directa de supresión de cáncer en humanos como un resultado del consumo de microorganismos probióticos, hay una gran cantidad de evidencias basadas en estudios de laboratorio. Se han demostrado actividades antimutagénicas de células vivas y muertas de diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* y de ácidos orgánicos usualmente producidos por esas bacterias probióticas, usando potentes químicos mutágenos y pro-mutágenos.

El mecanismo preciso de acción no está definido aún, sin embargo, pueden tener lugar una amplia variedad de mecanismos, entre los que destacan:

- a) aumento de la respuesta inmune del hospedero,
- b) unión y degradación potencial de carcinógenos, tales como nitrosaminas, y disminución de la actividad de nitroreductasa, en la síntesis de nitrosaminas.
- c) alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de la microflora intestinal,
- d) alteración de las actividades metabólicas de la microflora intestinal y alteración de condiciones fisicoquímicas en el colon.

- e) producción de compuestos antimutagénicos,
- f) supresión de tumores por un mecanismo de respuesta inmune
- g) modulación de enzimas procarcinogénicas en el intestino
- h) la supresión de bacterias generadoras de β -glucosidasa, β -glucoronidasa y azoreductasa, que catalizan la conversión de procarcinógenos a carcinógenos (Bomba, 2002).

La habilidad que tienen los miembros de la microflora gastrointestinal, de convertir precursores naturalmente presentes en las dietas a formas carcinogénicas por procesos enzimáticos, está ampliamente documentada (Bielecka. 2002). y es muy probable que contribuya a la etiología del cáncer de colon. Las LAB presentan niveles muy bajos de tales conversiones, en comparación con otras bacterias intestinales. (Bomba et al 2002). Diversos estudios en animales y humanos han demostrado la habilidad de las LAB para reducir la toxicidad del contenido intestinal suprimiendo los niveles de enzimas bacteriales tales como β -glucoronidasa, nitroreductasa, azo-reductasa y ureasa, todas ellas implicadas en la actividad procarcinógena (Salminen, 1998; Gopal, 2001; Lourens-Hattingh, 2001).

Además, algunos productos metabólicos finales de las LAB, tales como butirato y ácido butírico, tienen actividad antitumoral *in vitro*. Hay también un número de estudios animales *in vitro* e *in vivo* que demuestran la inhibición de tumores por LAB más directamente (Gill, 2001). En humanos, la evidencia para tales actividades es aun circunstancial. Sin embargo, Aso y colaboradores (1995) reportaron el primer caso clínico en el cual la administración oral de la cepa *L casei Shirota* mostró reducir la recurrencia de carcinoma superficial de vejiga en humanos. (Matsumoto, 2004; Philpott, 2004).

Una amplia variedad de bacterias (y también de levaduras) son capaces de unirse *in vitro* a mutágenos. Incluso se ha observado que células bacteriales no viables son capaces de unirse a mutágenos y carcinógenos. En humanos, pruebas con

cepas probióticas han sido asociadas con la reducción de mutágenos fecales o actividad enzimática fecal involucrada en activación mutagénica o carcinogénica. Las enzimas fecales tales como nitroreductasa y β -glucuronidasa tienen la habilidad de convertir pro-carcinógenos a carcinógenos en el colon. En estudios en humanos, el consumo de *L. acidophilus* NCFB 1748 mostró decrecimiento de mutagenicidad fecal y urinaria. La supresión de la mutagenicidad urinaria también ha sido mostrada después del consumo de cepas de *L. casei* Shirota. La suplementación con *L. rhamnosus* GG mostró la reducción de actividad de β -glucuronidasa fecal, nitroreductasa y ácido glicocólico hidrolasa en hembras sanas. La reducción de actividad enzimática fecal también se ha mostrado después del consumo de *L. gasseri* ADH (Adawi, 2001).

En Japón han llevado a cabo una serie de pruebas de alimentación animal que han mostrado que el kefir y los granos de kefir disminuyen o previenen el crecimiento de una amplia variedad de cánceres (Adawi, 2001).

La administración oral de la cepa de *L. casei* Shirota ha mostrado tener propiedades inhibitorias en tumores en ratas inducidos químicamente. El efecto benéfico de los probióticos en la terapia de cáncer ha sido asociado con sus propiedades antimutagénicas y la habilidad para modular parámetros inmunes, incluyendo células T, células killer (NK) y actividad macrófaga, los cuales son importantes para impedir el desarrollo del tumor (Matsumoto, 2004; Philpott, 2004).

Los estudios *in vivo* han mostrado una disminución en la actividad mutagénica de las aminas heterocíclicas (procarcinógenos) en presencia del *L. acidophilus*. El enlace directo de los procarcinógenos puede ser el responsable de este efecto (Lee, 1995; Orrhage, 1994; Matsumoto, 2004; Philpott, 2004).

7. PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Los efectos encontrados en la promoción del crecimiento mediante la suplementación de microorganismos probióticos han sido asociados al óptimo mantenimiento de la superficie epitelial del intestino, lo cual se traduce en una adecuada asimilación de nutrientes por parte del hospedero.

Un exitoso promotor del crecimiento, no sólo favorecer el crecimiento, también debe estar desprovisto de efectos adversos. Las LAB han sido consumidas en alimentos fermentados por varios siglos, sin algún efecto adverso obvio (Bernardeau, 2002).

El uso de cultivos de bacterias probióticas estimula el crecimiento de microorganismos preferentes, disminuyendo la población de bacterias potencialmente dañinas y reforzando el mecanismo de defensa natural del cuerpo (Puupponen, 2002).

Los ácidos orgánicos, junto con probióticos y carbohidratos específicos en particular los presentes en las paredes celulares de las levaduras, se han reportado frecuentemente como alternativa al uso de promotores de crecimiento de tipo antibiótico (Bomba, 2002).

Propiedades y mecanismos de acción propuestos.

- Fermentan alimentos que serían indigeribles de otro modo, obteniendo metabolitos benéficos a partir de ellos.
- Mejoran el proceso normal de la digestión, incrementando la absorción de minerales (entre ellos el calcio, lo que es interesante para evitar la osteoporosis), la producción de vitaminas (sobre todo las del tipo B, como niacina, ácido fólico, biotina y vitamina B6), y la recuperación de componentes valiosos (como los ácidos grasos de cadena corta).

- Protegen ecológicamente contra bacterias, hongos y virus patógenos, impidiendo que colonicen el tracto gastrointestinal, como sucede con la bacteria *Helicobacter pylori* causante de úlceras y cáncer gástrico.
- Regularizan del sistema digestivo, reduciendo procesos inflamatorios, producción de gases intestinales, etc.
- Tienen un papel inmunomodulador que les permite mejorar el desempeño del sistema inmunológico.

Las bacterias ácido lácticas y bifidobacterias han mostrado diversos efectos fisiológicos benéficos, como actividad antimicrobial, aumentando de potencia inmune y actividad antitumorigénica (Kullizaar, 2002).

Desde luego, la identificación y esclarecimiento de los mecanismos de acción de los probióticos, sigue siendo una de las áreas más interesantes e importantes en la investigación sobre probióticos, ya que de este conocimiento pueden obtenerse enormes beneficios.

CAPÍTULO VII

“APLICACIONES”

APLICACIONES

Las aplicaciones dadas a los microorganismos probióticos han sido variadas; desde su incorporación en alimentos humanos, en alimentos para ganado, en la conservación de alimentos, en la estabilización de la microflora intestinal, como coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades por su efectos favorables en el sistema inmunológico, etc.

El mayor interés por las dietas saludables está estimulando el desarrollo de nuevos productos dentro de la industria de alimentos (Kullisaar, 2002).

Actualmente, siguen predominando los productos probióticos lácteos, pero la intolerancia a la lactosa y el contenido de colesterol son dos desventajas relacionadas con su consumo en humanos. Betoret y colaboradores (2003) proponen la utilización de matrices de frutas y vegetales como vehículos. Ellos han aplicado tecnologías tales como impregnación por aspersión para incorporar componentes fisiológicamente activos en la estructura de frutas y vegetales, logrando introducir células microbiales en la matriz estructural de tejidos de manzana fresca por esta técnica.

Charalampopoulos y colaboradores (2002) por su parte, se han enfocado a la inclusión de microorganismos probióticos en productos de cereales para ofrecer a los consumidores alternativas tales como bebidas, papillas de avena, etc, en su búsqueda de productos probióticos no lácteos.

El uso de cultivos probióticos en los alimentos, también es frecuentemente restringido por su limitada estabilidad. Puupponen y colaboradores (2002) recomiendan una tecnología de encapsulación a la medida para probióticos, en la cual grandes gránulos de almidón de papa son tratados enzimáticamente y llenados simultáneamente con bacterias probióticas. A continuación, se precipita amilosa solubilizada para recubrir los gránulos de almidón llenos de bacterias. Finalmente, el producto es deshidratado. El material seco resultante, es un polvo suave conteniendo por lo menos 10^9 bacterias vivas por gramo y sus propiedades

físicas pueden conservarse aún a humedad ambiental alta, por casi seis meses de almacenamiento. El grupo de trabajo ha logrado aumentar la viabilidad y estabilidad en las matrices de almidón incorporadas a los alimentos con el uso de esta tecnología, además de obtener una liberación controlada durante la digestión del consumidor.

El uso de probióticos como coadyuvantes en el tratamiento de algunas enfermedades en humanos es cada vez más frecuente, debido a los resultados de investigaciones científicas que apoyan su utilización. Algunas de sus aplicaciones son:

- Protección contra desórdenes gastrointestinales, incluyendo infecciones y enfermedades estomacales inflamatorias (Cross, 2002).
- Coadyuvante en el tratamiento oncológico para hacer frente a la agresividad de los agentes quimioterapéuticos (Ouwehand, 1999).
- Prevención y tratamiento de desórdenes alérgicos (Kankaanpää, 2002).
- Mejoramiento de la asimilación de nutrientes (Collins, 1998).

Otra aplicación de gran interés es la utilización de microorganismos probióticos en la formulación de alimentos para ganado, reportándose resultados como:

- Promotores de crecimiento en el ganado porcino (Cabrera, 1989).
- Aumento en la resistencia a enfermedades en animales acuáticos (Tsunoda, 2002).
- Mejoramiento en la asimilación de nutrientes. Control del síndrome de la diarrea pos-destete de cerdos (Bomba, 2002).
- Estabilización de la flora intestinal, elaborando vitaminas, necesarias para aves de corral (Salminen, 1998).

- Síntesis de enzimas que ayudan a la digestión (Chiva, 2002).

Chiva y colaboradores (2002) presentan una interesante propuesta con la llamada "terapia de interferencia microbial" (MIT por sus siglas en inglés), la cual consiste en mantener o restaurar la salud introduciendo microorganismos vivos (probióticos) al hospedero, para estabilizar el balance de la flora intestinal. Ellos sugieren que los probióticos pueden ser usados en la prevención de infecciones bacterianas de origen intestinal en diferentes escenarios.

Las bacterias probióticas son frecuentemente usadas como el ingrediente activo de alimentos funcionales tales como bio-yogurts, dietéticos, y productos reguladores de la salud.

La utilización de bacterias probióticas como conservadores en productos alimenticios no es nuevo, sin embargo, ha sido retomado con la observación de que las bacterias ácido lácticas pueden actuar como cultivos probióticos y como conservadores en diversos productos cárnicos y lácteos (Stanton, 2001; Ogawa, 2001).

Ahola y colaboradores (2002) mostraron que el consumo de leche conteniendo *Lactobacillus* GG por periodos prolongados, causa una reducción significativa en el riesgo de caries en niños. LGG puede colonizar la cavidad oral.

Gardiner y colaboradores (2002) han probado la eficacia de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 en el tratamiento y prevención de infecciones urogenitales en mujeres.

Kaur y colaboradores (2002) reportan la obtención de una nueva clase de probióticos basados en cepas recombinantes de bacterias para producir determinadas proteínas terapéuticas. Las propiedades biológicas de *Bacillus subtilis* 2335 fueron transformadas por el plásmido codificante para la síntesis del interferón humano α -2. La cepa recombinante mostró una alta actividad

antagónica contra patógenos y adquirió propiedades antivirales marcadas debido a la síntesis del interferón; usando esta cepa se ha diseñado un nuevo probiótico que posee una combinación de propiedades antibacteriales y antivirales. Investigaciones clínicas y bacteriológicas durante y después de la administración oral en ratones, mostraron inocuidad y la ausencia de efectos colaterales. Se ha probado su habilidad para incrementar la efectividad de terapia antitumoral. El tratamiento combinado resultó en una inhibición significativamente alta del crecimiento de tumores primarios, en comparación con el grupo control que sólo recibió el medicamento.

Los estudios recientes se enfocan principalmente a la búsqueda y selección de más especies de bacterias probióticas. La aplicación de métodos de ingeniería genética puede ayudar a diseñar una nueva generación de probióticos con propiedades biológicas prediseñadas.

CAPÍTULO VIII

“DISCUSIÓN”

DISCUSIÓN

El uso de alimentos probióticos se ha dado desde épocas antiguas, sin que sus mecanismos de acción en el efecto de brindar beneficios a la salud del consumidor hayan sido completamente entendidos.

La primera propuesta dada por Metchnikoff a principios del siglo XX atribuyendo los efectos de la longevidad de los pueblos caucásicos al consumo de leche fermentada, no fue ampliamente aceptada, en principio, debido a la falta de conocimiento de los mecanismos de acción.

Desde la sugerencia hecha por Metchnikoff a la fecha, se ha generado una gran cantidad de resultados científicos que respaldan el uso de microorganismos probióticos, lo cual, a su vez, ha generado que el público considere esta otra alternativa en la prevención de enfermedades y el mejoramiento de la salud.

Las aplicaciones se han extendido no sólo al consumo en humanos, sino también se han generado productos para distintos animales de granja, e incluso se han incluido en las formulaciones de alimento para peces.

Se han realizado una gran cantidad de experimentos *in vitro* los cuales han permitido establecer las rutas mediante las cuales se ejercen los efectos positivos. Éstas se han comprobado en animales de laboratorio, y es necesario que se compruebe su absoluta inocuidad en seres humanos, antes de su aplicación en éstos.

Con la generación de una conciencia de la salud, observada cada vez más en la sociedad, donde hay una demanda continua por alimentos promotores de ésta, se ha visto estimulada la innovación y desarrollo de nuevos productos en la industria de alimentos. La industria de los alimentos está orientando el desarrollo de

nuevos productos al área de alimentos funcionales e ingredientes funcionales, debido a la demanda de los consumidores por estos "alimentos saludables".

En el campo de la terapéutica y la atención especial a pacientes con problemas serios o de larga duración, se han empleado diversas combinaciones de terapias específicas con probióticos; desde luego los estudios incluyen controles de pacientes a los cuales únicamente se dio el medicamento. Los resultados de muchos de estos estudios, han permitido respaldar el efecto probiótico como coadyuvante en la terapia.

También destacan, en los últimos años, estudios clínicos y experimentales que respaldan los efectos benéficos de las cepas probióticas en la salud humana y bienestar, ofreciendo a los consumidores tres principales efectos en la salud: el mejoramiento de la salud intestinal, la disminución de colesterol en la sangre, y el fortalecimiento de los mecanismos naturales de defensa del cuerpo.

El uso de microorganismos probióticos se presenta como una valiosa opción alternativa al tratamiento antibiótico. El mercado para los alimentos funcionales está creciendo a una velocidad muy rápida y los productos probióticos representan un área potencialmente creciente.

Aun con la gran cantidad de evidencia científica que respalda los efectos benéficos de los microorganismos probióticos en la salud de los consumidores, todavía falta mucho por conocer, se requiere saber más acerca de los mecanismos de acción, la selección de nuevas cepas y su aplicación en alimentos funcionales específicos.

CAPÍTULO IX

“CONCLUSIONES”

CONCLUSIONES

- En la actualidad se cuenta con una gran cantidad de estudios científicos que respaldan el uso de microorganismos probióticos

- Es de primordial importancia continuar en la búsqueda de los mecanismos por los cuales los microorganismos probióticos ejercen beneficios al consumidor.

- Se requieren métodos moleculares para examinar la microbiota intestinal y para mapear la ubicación y actividad de las cepas probióticas en el tracto intestinal, de modo que se puedan distinguir las cepas probióticas ingeridas, de las miles de cepas bacterianas nativas.

- Los principales desafíos para el futuro incluyen la incorporación de uno o más probióticos, en combinación con sustratos prebióticos adecuados, para aumentar la eficacia de la preparación para uso clínico.

- Cada mes surgen gran cantidad de publicaciones con evidencias que confirman los efectos benéficos de los probióticos en la salud de los consumidores; estos datos apoyan su uso en nuevas aplicaciones clínicas potenciales para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades.

- Debido al aumento significativo en el consumo de productos probióticos en el mundo, es importante que tales productos estén correctamente etiquetados y que la seguridad y funcionalidad de las cepas probióticas utilizadas estén bien documentadas.

- Considerando que la dieta es el principal blanco estratégico de salud, el desarrollo de alimentos que promueven la salud y bienestar debe ser una de las prioridades de la investigación en la industria alimentaria.

- Las investigaciones en tecnología son una de las áreas más importantes, para maximizar la estabilidad de características funcionales durante la manufactura, la formulación, el almacenamiento, y en el paso por el tracto intestinal.
- Adicionalmente, la eficacia del producto puede aumentarse mediante la interacción sinérgica entre los ingredientes funcionales como es, potencialmente, el caso de los probióticos al formar los simbióticos.
- Las tendencias futuras de las investigaciones científicas y tecnológicas deberán:
 - Estudiar el mecanismo de acción de los probióticos en el tracto gastrointestinal, y desarrollar herramientas de diagnóstico y biomarcadores para su valoración.
 - Evaluar el papel de los probióticos en la salud de los grupos consumidores.
 - Examinar el efecto de los probióticos en las infecciones y enfermedades gastrointestinales, y en alergias.
 - Asegurar la estabilidad y viabilidad de los productos probióticos mediante tecnologías modernas, como la bioencapsulación.
 - Desarrollar la tecnología para aplicación de probióticos no lácteos, por ejemplo basados en cereales.

- La ingeniería genética está jugando un papel muy importante en la obtención de cepas idóneas de probióticos. Seguramente en los próximos años habrá importantes desarrollos para obtener mejores cepas y productos.

CAPÍTULO X
“BIBLIOGRAFÍA”

1. Adawi, D., Ahrné, S., and molin, G. (2001). Effect of different probiotic strain of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. *International Journal of Food Microbiology* 70, 213-220.
2. Ahola, A. J., Yli-Knuuttila, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlström, A., Meurman, J.H. and Korpela, R. (2002). Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology* 47, 799-804.
3. Albillos, A. and Hera A. (2002) Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis and bacterial translocation: working out the role of probiotics and antioxidants. *Journal of Hepatology* 37 523–526.
4. Ali, A. Velasquez, M., Hansen, C., Mohamed A., Batean, S. (2005). Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 26 (2005) 213–219.
5. Ali, A., Velasquez, M., Hansen, C., Mohamed, A., Bhathena, S. (2005). Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 693–699.
6. Amrouche, T., Boutin, Y., Prioult, G., Fliss, I. (2006). Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. *International Dairy Journal* 16, 70–80.
7. Apostolou, E., Kirjavainen, P. V., Saxelin, M., Rautelin, H., Valtonen, V., Salminen, S. J., and Ouwehand, A. C. (2001). Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia?. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 31, 35-39.
8. Aso, Y., Akaza, H., & the BLP study group (1992). Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urology International*, 49, 125-129.
9. Aso, Y., Akaza, H., Kotake, T., Tsukamoto, T., Imai, K., Naito, S., & the BLP study group (1995). Preventive effect of *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. *European Urology*, 27, 104-109.
10. Awaisheh, S., Haddadin, M., Robinson, R. (2005). Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. *International Dairy Journal* 15 1184–1190.

11. Baccigalupi, L., Di Donato A., Parlato, M., Luongo, D., Carbone, V., Rossi, M., Ricca, E., De Felice, M. (2005). Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Research in Microbiology* 156, 830–836.
12. Bautista, C. R., Fernández, A. R., Posadas, A., Ixta, O. (2002). Increase resistance against murine experimental *Trichinella spiralis* infection using *Lactobacillus casei*. *Vet. Mex* 33, (2).
13. Begon, M., Harper J. L., y Townsen, C. R. (1995). *Ecología Individuos, poblaciones y comunidades*. Editorial: Ediciones Omega, S. A.
14. Bernardeau, M., Vernoux, J.P., and Gueguen, M. (2002). Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *International Journal of Food Microbiology* 77, 19-27.
15. Betoret, N., Puente, L., Diaz, M.J., García, M.J., Gras, M.L. Monzó, J.M., and Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering* 56, 273-277.
16. Bielecka, M., Biedrzycka, E., and Majkowska, A. (2002). Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Research International* 35, 125-131.
17. Blake, D.P., Hillman, K., and Fenlon, D.R. (2003). The use of a model ileum to investigate the effects of novel and existing antimicrobials on indigenous porcine gastrointestinal microflora, using vancomycin as an example. *Animal Feed Science and Technology* 103, 123-139.
18. Bodil Lund et al. (2002). Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain, administered with or without vancomycin. *Internacional Journal of food microbiology* 77, 109-115.
19. Boenke, A. (2002). Contribution of European research to anti-microbials and hormones. *Analytica Chimica Acta* 473, 83-87.
20. Bomba, A., Nemcová, R., Mudroňová, D., and Guba, P. (2002). The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Food Science & Technology* 13, 121-126.
21. Bonczar, G., Wszolek, M., and Siuta, A. (2002). The effects of certain factors on the properties of yogurt made from ewe's milk. *Food Chemistry*. 79, 85-91.
22. Buck LM & Gilliland SE (1994). Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *Journal of Dairy Science*. 77, 2925-2933.

23. Burity, F., da Rocha, J., Saad, S. (2005). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal* 15, 1279–1288.
24. Burns, A., Rowland, I. (2004). Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research* 55, 1233–243.
25. Cabrera, G. L. (1989). Uso de la levadura (*S. cerevisiae*) en lechones lactantes para prevención de diarreas y aumento en la ganancia de peso. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
26. Candela, M., Seibold, G., Vitali, B., Lachenmaier, S., Eikmanns, B., Brigidi, P. (2005) Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens *Research in Microbiology* 156, 887–895.
27. Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., and Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 70, 131-141.
28. Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S., and Webb, C. (2003) Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 82, 133-141.
29. Chiva, M., Soriano, G., Rochat, I., Peralta, C., Rochat, F., Llovet, T., Mirelis, B., Schiffrin, E. J., Guarner, C., and Balanzó, J. (2002). Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 37, 456-462.
30. Klaenhammer, T., Barrangou, R., Buck, L., Andrea Azcarate-Peril, M., Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria e.ecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29 393–409.
31. Collins, J. K., Thornton, G., and Sullivan G. O. (1998). Selection of Probiotic Strains for Human Applications. *International Dairy Journal* 8, 487-490.
32. Daniel Commane., Roisin Hughes, Colette Shortt, Ian Rowland. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research*. In Press, Corrected proof, Available online 10 August 2005.

33. Crittenden, R.G., Martinez, N.R., and Playne, M.J. (2003). Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80, 217-222.
34. Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34, 245-253.
35. Danielsen, M., and Wind, Anette. (2003) Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82, 1-11.
36. De Flores, M. G. (1995). Los vinos, los quesos y el pan. *Historia del vino*, Editorial Limusa, pp 16-20.
37. Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Collins, K., and Ross, R.P. (2002). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 12, 183-190.
38. Diniz, R. O., Garla, L. K., Schneedorf, J. M., and Carvalho, J. C. (2003). Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. *Pharmacological Research* 47, 49-52.
39. Doleyres, Y. Lacroix, C., (2005) Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal* 15 973-988.
40. El-Gawad, I., El-Sayed, E., Hafez, S., El-Zeini, H., Saleh, F. (2005). The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal* 15 37-44.
41. Elmer GW, McFarland LV. (2001). Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. *Gastroenterol Clinic Am*; 30, 837-852.
42. Fooks, L. J., and Gobson, G. R. (2002). *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology* 39, 67-75.
43. Forestier, C., Champs, C., Vatoux, C., and Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152, 167-173.

44. Foulquie, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2005). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. In Press, corrected Proof. Available online 10 October 2005.
45. Fuller, R., (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365– 378.
46. Fuller, R., (1991). Probiotics in human medicine. *Gut* 32, 439–442.
47. García, A., e Infante, L. (2000). Estudio de la colonización del tracto digestivo de los cerdos *Landrace X Duroc* por *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
48. Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, P.R., and Stanton, C. (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*. 12, 749-756.
49. Gardiner, G. E., Heinemann, C., Baroja, M.L., Bruce, A.W. Beuerman, D., Madrenas, J., and Reid, G. (2002). Oral administration of the probiotic combination: *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14, for human intestinal applications. *International Dairy Journal* 12, 191-196.
50. Gill, H. S, and Rutherford, K. J. (2001). Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) on leucocyte phagocytosis. *Nutrition Research* 21, 183-189.
51. Gomez-Gil, B., Roque, A., and Velasco-Blanco, G. (2002) Cultura of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potencial probiotic bacterium, with the microalgae *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture* 61, 901-906.
52. Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H. S. (2001). *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains, and antagonistic activity toward an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 67, 207-216.
53. Gopal P., Sullivan P. and Smart J. (2001). Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal* 11, 19-25.
54. Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology* 78, 119-131.

55. Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., and Fleet, G. H. (2002). Growth Medium for Culturing Probiotic Bacteria for Applications in Vegetarian Food Products. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology* 35, 171-176.
56. Holzapfel, W. H., and Schillinger, U. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International* 35, 109-116.
57. Hyeyoung, K., Kubum, K., Dae-Young K., Geun E. (2005). Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin-induced allergy mouse model. *Immunology and Medical Microbiology* 45, 259-267.
58. Ivanova, E., Teunou, E., Poncelet, Denis. (2005). Encapsulation of water sensitive products: effectiveness and assessment of fluid bed dry coating. *Journal of Food Engineering* 71 223-230.
59. Jahreis, G., Vogelsang, H., Kiessling, G., Schubert, R., Bunte, C., and Hammes, W. P. (2002). Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Research International* 35, 133-138.
60. Kankaanpää, P. E., Salminen, S. J., Isolauri, E., and Lee, Y. K. (2001). The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiology Letters* 194, 149-153.
61. Kankaanpää, P. E., Yang, B., Kallio, H.P., Isolauri, E., and Salminen, S. J. (2002). Influence of probiotic supplemented infant formula on composition of plasma lipids in atopic infants. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 364-369.
62. Kaur, I. P., Chopra, K., and Saini, A. (2002) Probiotics: Potential Pharmaceutical Applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 1-9.
63. Kelly, P., Maguire, P., Bennett, M., Fitzgerald, D., Edwards, R., Thiede, B., Treumann, A., Collins, K., Sullivan, G., Shanahan, F., Dunne, C. (2005). Correlation of probiotic *Lactobacillus salivarius* growth phase with its cell wall-associated proteome. *FEMS Microbiology Letters* 252, 153-159.
64. Kirjavainen, P. V., Apostolou, E., Arvola, T., Salminen, S. J., Gibson, G. R., and Isolauri, S. J. (2001). Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32, 1-7.

65. Kitazawa, H., Ino, T., Kawai, Y., Itoh, T., and Saito, T. (2002). A novel immunostimulating aspect of *Lactobacillus gasseri*: induction of "Gasserokine" as chemoattractants for macrophages. *International Journal of Food Microbiology* 77, 29-38.
66. Kitazawa H., Ueha S., Itoh S., Watanabe H., Konno K., Kawai Y., Saito T., Itoh T. and Yamaguchi T. (2001). AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 149-162.
67. Klaenhammer, T., Barrangou, R., Logan Buck, B., Azcarate-Peril A., Altermann, Eric. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393-409.
68. Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13, 3-13.
69. Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT* 39, 177-183.
70. Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., and Kilk A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 72, 215-224.
71. Laine, R., Salminen, S., Benno, Y., and Ouwehand, A. C. (2002). Performance of bifidobacteria in oat-based media. *International Journal of Food Microbiology* 83, 105-109.
72. Lee H, Rangavajhyala N, Grandjean C & Shahani KM (1995). Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus* on transformation of bile acids by human fecal microflora. *Microbiology Alim. Nutrition* 13, 241-247.
73. Leuschner, R. G., Bew, J., Coeuret, V., Vernoux, J. P. and Gueguen, M. (2003). A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic lactobacilli in animal feed. *Food Microbiology* 20, 57-66.
74. Lin, W., Hwang, C., Chen, L., Tsen, H. (2006). Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology* 23 74-81.
75. Losada, M., Olleros, T. (2002). Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutrition Research* 22, 71-84.
76. Lourenss-Hattingh, A., and Viljoen, B. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11, 1-17.

77. Lund, B., Adamsson, I., Edlund C. (2002). Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *International Journal of Food Microbiology* 77, 109–115.
78. Maragkoudakis, P., Miaris, C., Rojez, P., Manalis, N., Magkanari, F., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2006). Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *International Dairy Journal* 16 52–60
79. Marteau P, Vaerman JP, Dehenin JP, Pochart P, Desjeux JF & Rambaud JC (1996). Effects of *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 on serum concentration and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. In SOMED 21st International Congress on Microbial Ecology and Disease, Paris, October 28-30 1996. Institut Pasteur, Paris, France. p. 44 (Abstract).
80. Marteau, P., Seksik, P., and Jian, R. (2002). Probiotics and health: new facts and ideas. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 486-489.
81. Mårtensson, O., Öste, R., and Holst, O. (2002). The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Research International* 35, 775-784.
82. Matsumoto, M., Benno Y. (2004). Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research* 568 147–153.
83. Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden R., Mogensen G., Fond, R., Saarela M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12, 173–182.
84. Maukonen, J., Alakomi, H., Nohynek, L., Hallamaa, K. Leppämäki, S., Mättö, J., Saarela M. (2006). Suitability of the Xurorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products *Food Research International* 39, 22–32.
85. McIntosh, G. H., and Leu, R. K. (2001). The influence of dietary proteins on colon cancer risk. *Nutrition Research* 21, 1053-1066.
86. McMastera, L.D., Kokotta, S.A., Reidb, S.J., Abrattb, V.R. (2005). Use of traditional African fermented beverages as delivery vehicles for *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. *International Journal of Food Microbiology* 102, 231–237.

87. Meriluoto, J., Gueimondeb, M., Haskard, C., Spoofa, L., Sjövala, O., Salminen, S. (2005). Short communication Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. by human probiotics. *Toxicon* 46, 111–114.
88. Moreno, A., Matar, C., Thériault, C., Perdigon G. (2005). Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model. *Immunobiology* 210, 349–358.
89. Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takana, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, T., and Takeda Y. (2001). Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strain due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology* 68, 135–140.
90. Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, Nord CE & Rafter J (1994). Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutation Res.* 311, 239–248.
91. Östman, E., Elmståhl, H., Molin, G., Lundquist, I., Björck, I. (2005). A diet based on wheat bread baked with lactic acid improves glucose tolerance in hyperinsulinaemic Zucker (fa/fa) rats. *Journal of Cereal Science.* 42, 300–308.
92. Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., and Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 9, 43–52.
93. Pelletier C., Bouley, C., Cayuela, C., (1997). Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 63, 1725–1731
94. Penner, R., Fedorak, R. and Madsen K. 2005. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 5:596–603.
95. Philpott, M., Ferguson, L., (2004) Immunonutrition and cancer *Mutation Research* 551, 29–42.
96. Pidcock, K., Heard, G. M. and Henriksson, A. (2002). Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology* 76, 75–81.

97. Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L., Fadda, G., (2005). Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 103 295– 304.
98. Puupponem-Pimiä, R. P., Aura, A. M., Caldentey, K. M., Myllärinen, P., Saarela, M., Sandholm, T. M., and Poutanen, K. (2002). Development of functional ingredients for gut health. *Food Science & Technology* 13, 3-11.
99. Pradal-Roa, P. (1994). Bacteria in post-antimicrobial enteritis in weaned pigs. Thesis for degree of Doctor. Department of Veterinary Pathology University of Glasgow.
100. Prasad, J., Gill, H., Smart, J., and Gopal, P. K. (1998). Selection and Characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for use as probiotics. *Dairy Journal* 8, 993-1002.
101. Ramos, R. V., and Solomons, N.W. (2002). Preventive nutrition: its changing context in MesoAmerica. *Nutrition Research* 22, 145-152.
102. Rastall, R.A., and Maitin, V. (2002). Prebiotics and symbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 490-496.
103. Reid, G., Bruce, A. W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J., and Henning, B. (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 30, 49-52.
104. Reid, G., Howard, J., and Gan, B. S. (2001) Can bacterial interference prevents infection? *TRENDS in Microbiology* Vol. 9 No. 9.
105. Reuter, G., Klein, G., and Goldberg, M. (2002). Identification of probiotic cultures in food samples. *Food Research International* 35, 117-124.
106. Rogelj, I., Matijašić, B. B., Majhenić, A. Č., and Stojković, S. (2002). The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 76, 83-91.
107. Roy, D. (2001). Media for isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 69, 167-182.
108. Saarela, M., Hallamaa, K., Sandholm, T. M., and Mättö. (2003). The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal* 13, 291-302.

109. Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., and Sandholm, T. M. (2002). Gut bacteria and health foods. The European perspective. *International Journal of Food Microbiology* 78, 99-117.
110. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Sandholm, T. M. (2000). Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological properties. *Journal of Biotechnology* 84 197-215.
111. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(Suppl. 1), 147-171.
112. Salminen, S.J., Ouwehand, A.C., Benno, Y., Lee, Y.K., (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology* 10, 107-110.
113. Sandholm, T.M. Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., and Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12, 173-182.
114. Sauter, S., Allenspach, K., Gaschen, F., Gröne, A. Ontsouka, E., Blum, J. (2005). Cytokine expression in an ex vivo culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: Modulation by probiotic bacteria. *Domestic Animal Endocrinology* 29 605-622.
115. Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fondén, R., Reniero, R., and Sandholm, T. M. (1999). The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10, 387-392.
116. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM & Donnet-Hughes A (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 78, 491-497.
117. Schiffrin, E. J., and Blum, S. (2001). Food Processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 499-502.
118. Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal* 15 1289-1297.
119. Shihata, A., and Shah, N. P. (2002). Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exo-polysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal* 12, 765-772.

120. Sindhu S. C. and Khetarpaul N. (2001). Probiotic Fermentation of Indigenous Food Mixture: Effect on Antinutrients and Digestibility of Starch and Protein. *Journal of food composition and analysis* 14, 601-609.
121. Shu, Q., and Gill, H. S. (2002). Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001(DR20™) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34, 59-64.
122. Silvi, S., Verdenelli, M.C., Orpianesi, C., and Cresci, A. (2002). Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strain from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. *Journal of Food Engineering*. 56, 195-200.
123. Sindhu, S. C., and Khetarpaul, N. (2001). Probiotic fermentation of indigenous Food Mixture: Effect on antinutrients and Digestibility of starch and protein. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 601-609.
124. Stanton, Robert. (2001). A Handbook of Probiotics • BOOK REVIEW *Bioresource Technology* 76, 289-290.
125. Sullivan, A., Palmgren, A. C., and Nord, C. E. (2001). Effect of *Lactobacillus paracasei* on intestinal colonization of *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Clostridium difficile* in elderly persons. *ANAEROBE. Ecology & Environmental Microbiology*. 07, 67-70.
126. Tanida , M., Yamano, T., Maeda, K., Okumura, N., Fukushima, Y., Nagai, K., (2005). Effects of intraduodenal injection of *Lactobacillus johnsonii* La1 on renal sympathetic nerve activity and blood pressure in urethane-anesthetized rats *Neuroscience Letters* 389, 109–114.
127. Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., and Swings, J. (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* 81, 1-10.
128. Tsunoda, A., Shibusawa, M., Tsunoda, Y., Watanabe, M., Nomoto, K., and Kusano, M. (2002). Effect of *Lactobacillus casei* on a novel murine model of abdominal sepsis. *Journal of Surgical Research* 107, 37-43.
129. Työppönen, S., Petäjä, E., and Sandholm, T. M. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* 83, 233-244.
130. Vaughan, E., Heilig, H., Ben-Amor, K., de Vos, W. (2005) Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 477–490.

131. Vinderola, C. G., Costa, G. A., Regenhardt, S., and Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 12, 579-589.
132. Wilson, B. A., and Salyers, A. A. (2002). Ecology and physiology of infectious bacteria-implications for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 267-274.
133. Wright, A., Salmela, T. V., Llopis, M.P., Collins, K., Kiely, B., Shanahan, F., and Dunne, C. (2002). The survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patients with ulcerative colitis. *International Dairy Journal* 12, 197-200.
134. Yi-Chieh Wang, Roch-Chui Yu, Cheng-Chun Chou. (2006) Antioxidative activities of soymilkfermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 23, 128-135.