

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**



**“DESARROLLO DE UNA LECHE DE CABRA FERMENTADA  
CON UNA CEPA PROBIÓTICA DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*:  
BIODISPONIBILIDAD MINERAL Y EFECTOS SOBRE LA BARRERA  
DE PERMEABILIDAD INTESTINAL Y LA MICROBIOTA FECAL”**

**TESIS DOCTORAL**

**TRIANA BERGILLOS MECA**

2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Triana Bergillos Meca  
D.L.: GR 2361-2014  
ISBN: 978-84-9083-040-6



**Dra. D<sup>a</sup> Reyes Artacho Martín-Lagos. Profesora Titular de la Universidad de Granada.**

**Dra. D<sup>a</sup> Carmen Cabrera Vique. Catedrática de la Universidad de Granada.**

**Dra. D<sup>a</sup> María Dolores Ruiz López. Catedrática de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICAN:**

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: “Desarrollo de una leche de cabra fermentada con una cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum*: biodisponibilidad mineral y efectos sobre la barrera de permeabilidad intestinal y la microbiota fecal” han sido realizados bajo nuestra dirección por la Licenciada Triana Bergillos Meca y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada con el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, Febrero de 2014.



**Dr. D. Miguel Navarro Alarcón**, Catedrático y Director del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por Doña **Triana Bergillos Meca**, Licenciada en Farmacia y Máster en Nutrición Humana por la Universidad de Granada, en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

Granada, 7 de Febrero de 2014.

**Fdo. Miguel Navarro Alarcón**



La doctoranda, **D<sup>a</sup>. Triana Bergillos Meca**, y las directoras de la tesis, **D<sup>a</sup>. Reyes Artacho Martín-Lagos**, **D<sup>a</sup>. Carmen Cabrera Vique** y **D<sup>a</sup>. María Dolores Ruiz López**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Febrero de 2014.

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

**Dra. D<sup>a</sup>. Reyes Artacho Martín-Lagos**

**Lda. D<sup>a</sup>. Triana Bergillos Meca**

**Dra. D<sup>a</sup>. Carmen Cabrera Vique**

**Dra. D<sup>a</sup>. María Dolores Ruiz López**



La presente Memoria de Tesis Doctoral se ha realizado gracias a la concesión de una Beca de Personal Investigador en Formación, asociada al Proyecto de Investigación de Excelencia AGR-4915 “La leche de cabra como base para la elaboración de un fermentado lácteo. Propuesta de un alimento funcional”, subvencionado por la Junta de Andalucía. El trabajo experimental se ha realizado en los Departamentos de Nutrición y Bromatología y de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, y en el “Department of Food and Nutritional Sciences” de la Universidad de Reading (Reino Unido). Además, algunas de las técnicas aplicadas han sido optimizadas en colaboración con el Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín, Granada (CSIC).



# Agradecimientos

Esta tesis no sólo representa un trabajo de investigación, sino también una etapa de mi vida llena de cambios y emociones. Nada de esto habría sido posible sin el apoyo de la gente que me rodea y, si hoy me siento orgullosa y afortunada, es gracias a vosotros...

A mis directoras, Loli, Carmen y Reyes, por apostar por mí y darme la oportunidad de empezar mi carrera en el mundo de la investigación. Por enseñarme, guiarme y aconsejarme. Por su dedicación, cercanía y cariño. A Carmen, por cuidarme y animarme como una amiga.

A mis “directores no oficiales”, Isabel, Alfonso, María, Nani, Ana, Adele y Gemma, por transmitirme una pequeña parte de su inmensa sabiduría, siempre engalanada con la mejor de sus sonrisas.

A Manolo, Miguel y Rafa, que me mostraron su más sincero apoyo. A los compañeros del departamento que se interesaron por mí. A las personitas que hicieron mis días más llevaderos, Tarsi, Vicky, Luis, Moisés, Estrella, Antonia.

A toda la trupe que me animó en la rebotica, compartiendo sonrisas y lágrimas: Miriam, Jimmy, Cris, Celia, M<sup>a</sup> del Mar, Vero, Jessica, Soumi, Bea, Thayra, Sensi. A las niñas del CSIC, por acogerme como una más.

To the people who made Reading my second home: Isidro, Tania, Cat, Natalia, María, Noura, Sandra, Rosa, Filipa, Elena, my angels Manu & Robby, Heather, la mafia...

A mi familia, por hacer de mí quien soy, por educarme con cariño y alegría, por enseñarme a perseguir mis metas, por apoyarme siempre. A mis hermanos, por formar el mejor equipo del mundo, por ser mi energía. A los luceros que nos iluminan.

A mis amig@s, huercaleses y esclavas, por la risoterapia, porque no hay palabras para definir nuestra amistad, por llenar mi vida.

A Miri, por recargar día a día las pilas de mi cabeza, y de mi corazón.

Al bendito lugar, a quien me hace reír, a quien me hace sentir... a ti.



***A mi abuela María...***



*“Lo que cuenta en la vida no es el mero hecho de haber vivido. Son los cambios que hemos provocado en las vidas de los demás lo que determina el significado de la nuestra”*

***Nelson Mandela***



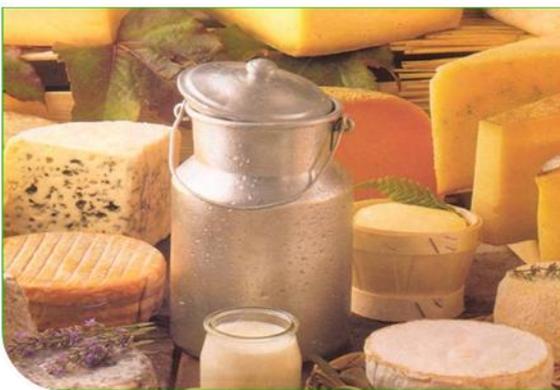
## **CONTENIDOS**

Capítulo I .....	p. 1
Capítulo II .....	p. 97
Capítulo III .....	p. 201
Capítulo IV.....	p. 265
Resumen y conclusiones .....	p. 321
Summary and conclusions.....	p. 327
Índice de Figuras .....	p. 333
Índice de Tablas .....	p. 337



# CAPÍTULO I

**Diseño y desarrollo de una leche fermentada con efecto probiótico**



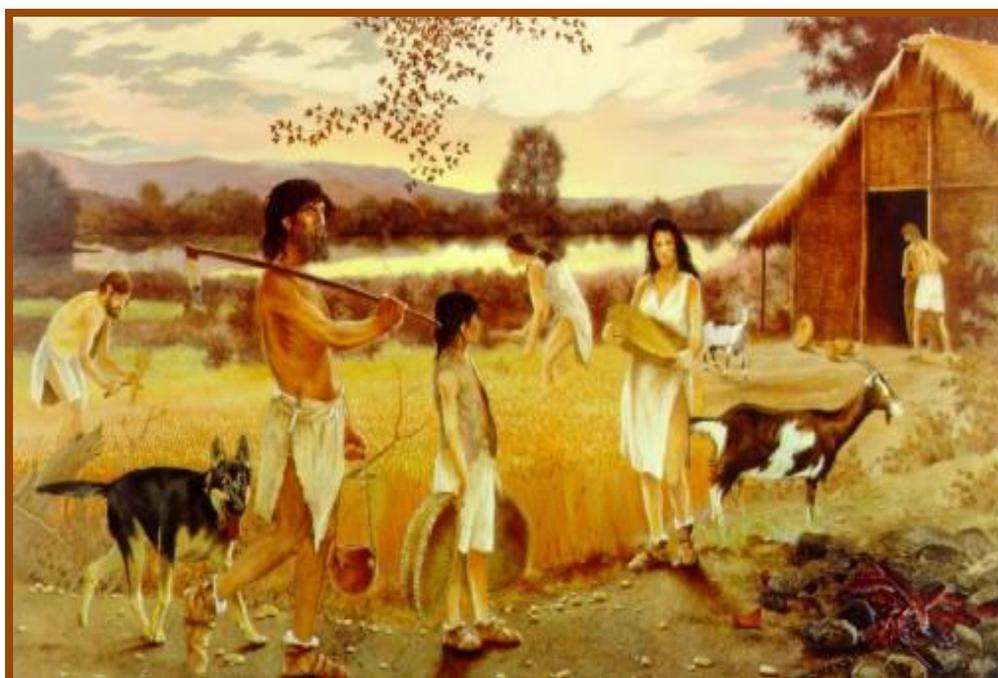


# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>2. LECHE Y LECHE FERMENTADAS</b> .....	9
2.1. Definición y tipos .....	11
2.2. Consumo.....	17
2.3. Interés nutricional .....	18
<b>3. LECHE DE CABRA</b> .....	21
3.1. Producción .....	23
3.2. Interés nutricional .....	26
<b>4. LECHE DE CABRA FERMENTADAS</b> .....	31
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	39
6.1. Instrumentación.....	41
6.2. Reactivos .....	41
6.3. Proceso de elaboración de la leche fermentada .....	42
6.4. Estudio microbiológico .....	46
• Evaluación del crecimiento de los cultivos .....	46
• Ensayos de antibiosis .....	47
• Consumo preferente .....	48
6.5. Análisis físico-químico .....	49
6.6. Estudio de la textura.....	53
• Sinéresis .....	53
• Viscosidad .....	54

<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	55
7.1. Optimización del proceso de elaboración de la leche fermentada .....	60
7.2. Estudio microbiológico.....	63
• Evaluación del crecimiento de los cultivos.....	63
• Ensayos de antibiosis.....	66
• Consumo preferente.....	68
7.3. Análisis físico-químico .....	70
7.4. Estudio de la textura.....	73
• Sinéresis .....	73
• Viscosidad.....	74
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	79
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	83

# 1. INTRODUCCIÓN





El consumo de leche y derivados se remonta a la prehistoria. En el mesolítico, el hombre pasó de tan sólo cazar y recolectar alimentos, al cultivo agrícola y a la cría de ganado, aprovechando el excedente de leche producido por las hembras de los mamíferos domésticos. Fue entonces cuando la leche fue considerada uno de los alimentos más completos. Además, en numerosas culturas la leche fue sinónimo de salud, riqueza, fecundidad y pureza. Según la mitología griega, Zeus se alimentó con leche de cabra. Hipócrates describió efectos medicinales de la leche sola o mezclada y en la Biblia se describe la tierra prometida “rebosante de leche y miel” (Tur, 2005). Los primeros escritos sobre la utilización de la leche como alimento, proceden de Sumeria y Babilonia. No siempre la leche ocupó un lugar privilegiado en la alimentación, en la antigüedad, griegos y romanos, consumían poca leche, únicamente el queso era fundamental en su dieta, y en la Edad Media y hasta el siglo XVIII, el consumo de leche se centraba en el mundo rural. Era un alimento pocopreciado, que incluso generaba desconfianza, entre otras cosas por ser vehículo de la brucelosis o fiebre de Malta, muy frecuente en esta época y que tanto afectaba a la leche de cabra (Cabrera y col., 2013).

En el siglo XIX, con los grandes avances de la ciencia y la tecnología, se solventaron los problemas de transporte y se comenzó a extender su consumo; en el siglo XX, se introdujo progresivamente la cadena de frío y las nuevas técnicas de conservación, que han permitido que la leche se convierta en la materia prima de una importante industria, la industria láctea, y que esté al alcance de los consumidores de forma cómoda, segura y económica.

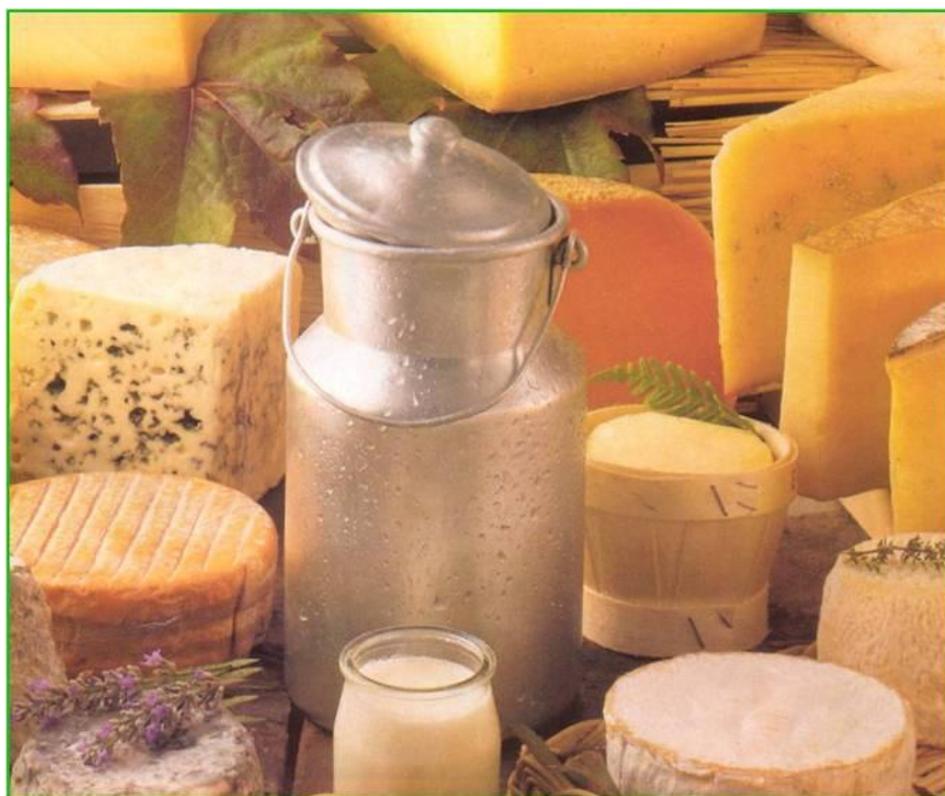
En cuanto a las leches fermentadas, producto lácteo al que se alude ya en la Biblia, su origen radica seguramente en las fermentaciones espontáneas que la leche sufría cuando se guardaba en pieles, vejigas o trozos de tripa de los animales y se exponía al sol. Éstas se consumen desde la antigüedad, especialmente en algunos países orientales (Asia, Europa Central) y posiblemente sean más antiguas en la historia que los quesos. Su importancia siempre fue menor que otros derivados lácteos como el queso, dado que la vida útil es muy reducida y ha sido necesaria la expansión del frío industrial y doméstico para extender su uso a grandes sectores de la población.

En la actualidad, la leche de vaca es la más empleada en todo el mundo occidental, por su mayor disponibilidad. La procedente de otras especies rumiantes puede constituir debido a su composición, una alternativa a la de vaca (Haenlein, 2004). En otras sociedades se consume leche de búfala, camella, yak, reno, llama o yegua. Hasta principios del siglo XX la leche de cabra jugó un papel primordial en la dieta

mediterránea, que hoy en día intenta resurgir apoyado por sus propiedades saludables científicamente demostradas, por el “boom” de los productos ecológicos y su implicación en el desarrollo sostenible de muchas comarcas y para respetar la cuota lechera establecida por la Unión Europea para la leche de vaca, entre otros factores. En cualquier caso, la productividad de la vaca supera, en gran medida, al ganado caprino (Cabrera y col., 2013).

A pesar de la mayor disponibilidad de leche de vaca, la producción y aprovechamiento de la leche de cabra es un nicho esencial para las industrias lácteas, debido a sus beneficios nutricionales. Es por ello, que resulta necesaria una mayor difusión e investigación, tanto en países en vías de desarrollo como en los más desarrollados, a fin de conseguir una mayor evidencia del valor de la leche de cabra para el bienestar y la nutrición humana.

## 2. LECHE Y LECHE FERMENTADAS





## 2.1. Definición y tipos

La **leche**, desde un punto de vista biológico, es la secreción de las hembras de los mamíferos, cuya misión es satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido en sus primeros meses de vida. Es una mezcla compleja y peculiar de agua, grasa, proteínas y otros compuestos nitrogenados, hidratos de carbono, vitaminas y sales minerales, en el que coexisten tres sistemas físico-químicos en forma de suspensión, emulsión y solución. Según el Código Alimentario Español (CAE, 2006), se entiende por *leche natural* el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas. Con la denominación genérica *leche* se entiende única y exclusivamente la leche de vaca. La leche de otras especies de mamíferos se designa indicando el nombre de la especie, por ejemplo, leche de cabra.

La leche puede considerarse fuente de macro y micronutrientes, conteniendo además, un cierto número de compuestos bioactivos que juegan un importante papel tanto nutritivo como de protección de la salud (Martemucci y col., 2013).

En los últimos años, se han ido desarrollando y normalizando las tecnologías aplicadas para la producción de derivados lácteos clásicos (queso, yogur, mantequilla, helados de leche, etc.) y de los derivados con valor añadido que incluyen, entre otros, productos con bajo contenido en lactosa o sin lactosa, con menor contenido en materia grasa, enriquecidos con vitaminas, minerales, ácidos grasos  $\omega$ -3, fitosteroles, fibra, prebióticos y probióticos, etc. y que son la base del gran desarrollo que tienen en la actualidad los alimentos funcionales (Özer y col., 2010). Tecnologías como la ultrafiltración para concentrar la leche y aumentar el extracto seco, permiten además, obtener productos de una gran calidad sensorial, indispensable para incrementar la aceptación de los alimentos funcionales por parte del consumidor. El hecho de contar con una fase hidrofílica y otra lipofílica hace que la leche sea un vehículo excelente para la adición de componentes saludables o eliminación de ciertos componentes que podrían causar intolerancias y problemas de salud, como la lactosa o la grasa. Además, es un alimento altamente recomendable y de consumo diario, fácil de adquirir y de ingerir a cualquier edad. Todo ello justifica que la leche se considere una matriz alimentaria ideal para el desarrollo de alimentos funcionales.

Bajo la denominación de **leches fermentadas** se engloba una serie de productos que se obtienen utilizando leche en sus diversas formas como materia prima, a la cual se le inocula un cultivo de microorganismos específicos que fermentan la lactosa produciendo modificaciones nutricionales y sensoriales que caracterizan al producto final. En este proceso, parte de la lactosa es transformada en ácido láctico, por lo que a estos productos también se les denomina *leches ácidas*. También se producen anhídrido carbónico, ácido acético, acetaldehído, diacetilo y otros compuestos que confieren a cada uno de los productos unas características organolépticas específicas. Además, algunas bacterias también producen polisacáridos que confieren a la leche fermentada una textura suave y cremosa, una menor sinéresis y una mejor viscosidad (Staff, 2000; Stack y col., 2010).

Durante el proceso de fermentación, el cambio principal que se da en la leche es el descenso del pH hasta 4,6 - 4,0. Como consecuencia de este descenso, se produce la coagulación de la caseína que da lugar a la formación de un gel, así como también la inhibición del desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos, debido a la producción de ácido láctico y otros metabolitos menores como el ácido acético, agua oxigenada y bacteriocinas, un potencial oxido-reductor bajo y el consumo por parte de las bacterias lácticas de componentes que son vitales para otros microorganismos.

En cuanto al proceso de coagulación, consiste en la conversión de la leche líquida en un gel, debido a la ruptura del equilibrio coloidal en el que se encuentran las partículas de fosfocaseinato cálcico, lo que origina que precipiten las micelas de caseína y formen un gel tridimensional que retiene grasa, agua, sales, etc. La coagulación puede ser por acidificación (coagulación ácida) o por la acción de enzimas coagulantes (coagulación enzimática) (López-Fandiño, 1993). En el caso de leches fermentadas, la coagulación es ácida y viene producida por una disminución del pH de la leche, debido al ácido láctico originado por la fermentación de la lactosa por las bacterias lácticas. El descenso del pH disminuye la ionización de los radicales ácidos de las caseínas, con un desplazamiento progresivo del calcio y del fosfato inorgánico de las micelas hacia la fase acuosa (lactosuero) y una desmineralización de las mismas a pH menores de 5. La migración del calcio y del fosfato, se acompaña de una desintegración de la estructura micelar. La velocidad de acidificación debe ser progresiva si se desea obtener un coágulo homogéneo (Brule y col., 1990). Cuando en la elaboración se utiliza coagulación ácida, la  $\alpha$ -caseína permanece intacta y es la inestabilidad de las caseínas alrededor de su punto isoeléctrico lo que determina su precipitación (Robinson, 1995).

La Federación Internacional de Lechería (FIL) clasifica las leches fermentadas según el tipo de fermentación:

- Mediante microorganismos termófilos (fermentación entre 30-45°C). Ejemplos:
  - Yogur: obtenido por la acción de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.
  - Leche acidófila: obtenida por *Lactobacillus acidophilus*.
- Mediante microorganismos mesófilos (fermentación por debajo de los 30°C):
  - Por fermentación láctica (ej. leche acidificada por *Lactococcus lactis*)
  - Por fermentación láctica y alcohólica (ej. kéfir y koumis)

Entre las leches fermentadas, destacamos el yogur y otras leches fermentadas con adición de microorganismos probióticos.

- **Yogur.** El Real Decreto 179/2003, por el que se aprueba la norma de calidad para el yogur, define *yogur* o *yoghourt* como “el producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada pasteurizada total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, suero en polvo, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche”.

Esta norma establece, entre otros requisitos, que:

- Los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en cantidad mínima de  $10^7$  colonias por gramo o mililitro.
- Todos los yogures deberán tener un pH igual o inferior a 4,6.
- El yogur, desde el momento de su fabricación hasta su adquisición por el consumidor, se mantendrá a temperaturas comprendidas entre 1 y 8°C.

El Real Decreto 176/2013 de 29 de Marzo de 2013 deroga el requisito establecido en el Real Decreto 179/2003 de la venta del yogur dentro de los 28 días siguientes desde su fabricación. De esta forma, actualmente recae sobre las

industrias lácteas la responsabilidad de estimar el tiempo de vida útil de sus yogures.

El Real Decreto 179/2003, igualmente, autoriza la denominación de *yogur pasteurizado después de la fermentación* o *yoghourt pasteurizado después de la fermentación* para “el producto obtenido a partir del yogur o yoghurt que, como consecuencia de la aplicación de un tratamiento por calor posterior a la fermentación equivalente a una pasteurización, ha perdido la viabilidad de las bacterias lácticas específicas y cumple todos los requisitos establecidos para el yogur en esta norma, salvo las excepciones indicadas en ésta”. La diferencia entre los dos productos estriba en que el yogur pasteurizado después de la fermentación es sometido, como su propio nombre indica, a un tratamiento térmico para alargar la vida comercial del producto hasta tres meses o más, además de no necesitar frío para su conservación. En este proceso se destruyen prácticamente todas las bacterias lácticas específicas del yogur. Si bien el valor nutricional no se modifica sensiblemente, todo aquel beneficio para la salud que pueda estar relacionado con la existencia de bacterias lácticas vivas se pierde.

• **Leches fermentadas con probióticos.** Existe una nueva generación de leches fermentadas, a las que hasta hace poco tiempo se las denominaba comercialmente añadiéndoles el prefijo “bio”, término reservado actualmente a productos con certificación biológica o ecológica. La principal característica de estos productos es que a los fermentos lácticos tradicionales se les asocian otros microorganismos vivos conocidos como probióticos, que pertenecen fundamentalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se caracterizan por su capacidad para sobrevivir después del paso por el aparato digestivo, contribuir a mejorar el balance microbiano intestinal, y de esta forma ejercer una influencia positiva en la salud del huésped (Baró y col., 2010).

Dichos microorganismos probióticos colonizan el intestino, protegen frente a bacterias patógenas, pueden recuperar el equilibrio de la microbiota intestinal, facilitando el funcionamiento del tubo digestivo y actualmente se les atribuyen propiedades como disminución del riesgo de ciertos tipos de cáncer, aumento de la biodisponibilidad de minerales y mejora en la digestibilidad de la lactosa, aspectos que se detallan más adelante (Slacanac y col., 2010, Bergillos-Meca y col., 2013).

La FAO/OMS define los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”. La mayoría de los probióticos pertenecen al grupo de las bacterias productoras de ácido láctico, como algunas especies del género *Lactobacillus*, cuya utilización se remonta a principios del siglo XX (Nissle, 1925; Rettger y col., 1936), pero también se consideran probióticos determinadas especies del género *Bifidobacterium*, algunas levaduras como *Saccharomyces boulardii* e incluso alguna cepa de la especie *Escherichia coli* (Charteris y col., 1998; Tannock, 1999). Las bacterias del yogur y las pertenecientes al género *Lactococcus* no se consideran probióticas, ya que su origen no es humano ni pueden implantarse en el intestino humano (Romero y col., 2004).

Los criterios de selección de los probióticos son los siguientes:

- No ser patógenos.
- Ser tecnológicamente utilizables.
- Sobrevivir al paso por el tracto digestivo y recuperarse en las materias fecales.
- Alcanzar su lugar de acción en el intestino en buenas condiciones.
- Poseer capacidad de adherirse a la superficie de las mucosas y prevenir la adhesión y colonización de patógenos.
- Tener efectos positivos sobre la salud del consumidor.

Los probióticos deben ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino, es decir, deben ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en el intestino, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis y a las enzimas digestivas (Baró y col., 2010).

Durante el proceso de elaboración de las leches fermentadas, es necesario controlar rigurosamente un gran número de factores para obtener un producto final de calidad: altos niveles de los microorganismos probióticos y las características adecuadas de sabor, aroma, aspecto y textura. Estos factores comprenden la selección adecuada de leche de alta calidad como materia prima, los ingredientes añadidos, el tratamiento térmico, el control de pH y la preparación del cultivo, entre otros (Staff, 2000). La refrigeración y el pH del producto final son factores clave para mantener altos niveles de bacterias probióticas, cuyos efectos beneficiosos variarán según la

cantidad ingerida y la duración de la administración (Kongo y col., 2006; Minervini y col., 2009).

Los probióticos más conocidos y de mayor utilización son: *Lactobacillus plantarum* 299, *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach Goldin (LGG), *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium* (Montrose y col., 2005).

En lo que respecta a *L. plantarum*, se han estudiado distintas cepas y se ha demostrado que tienen propiedades probióticas, no son patógenas, pueden producir péptidos antimicrobianos y proporcionar otros beneficios para la salud, como mejora en la respuesta linfocitaria, modulación de la microbiota intestinal caprina y con ello también de la composición de ácidos grasos en leche de cabra, etc. (Bujalance y col., 2007; Maragkoudakis y col., 2010; Prins y col., 2010). Además, se ha observado que los exopolisacáridos producidos por dichas bacterias ácido-lácticas pueden mejorar las características reológicas de los productos lácteos fermentados, constituyendo una alternativa natural a los aditivos comerciales de origen vegetal o animal, normalmente modificados químicamente (Ismail y col., 2010; Stack y col., 2010).

El microorganismo objeto del presente trabajo, *L. plantarum* C4, es una cepa aislada de un kéfir comercial (Bujalance y col., 2007). Recientes investigaciones han demostrado que ésta cumple los criterios de bacterias potencialmente probióticas, ya que resiste el pH ácido y la bilis y posee propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras. Además, se ha observado que la leche desnatada tiene capacidad como tampón y es un vehículo apropiado para la administración intragástrica de *L. plantarum* C4 en ratones (Bujalance y col., 2007). Fuentes y col. (2008) analizaron muestras de ratones alimentados con *L. plantarum* C4 bajo diferentes condiciones inmunológicas; sus resultados mostraron la presencia del probiótico en el intestino y una expansión de bacterias filamentosas en el íleon de los ratones inmunodeficientes, que fue suprimida por la administración de *L. plantarum* C4. Además, el mismo grupo de investigación observó un incremento de lactobacilos en heces y muestras de intestino de ratones tras recibir una mezcla de *L. plantarum* C4 y *L. casei* (Fuentes y col., 2008b). Puertollano y col. (2008) observaron que la administración oral de *L. plantarum* C4 redujo la producción de interleuquinas (IL) proinflamatorias en ratones infectados con *Listeria monocytogenes*, especulando que esta cepa podría ejercer efectos antiinflamatorios; más tarde, llevaron a cabo el primer estudio *in vitro* sobre actividad antimicrobiana y biológica de sobrenadantes concentrados de *L. plantarum*, observando que *L. plantarum* C4 libera un compuesto responsable de la ruptura de la membrana plasmática de *Escherichia coli* y de una

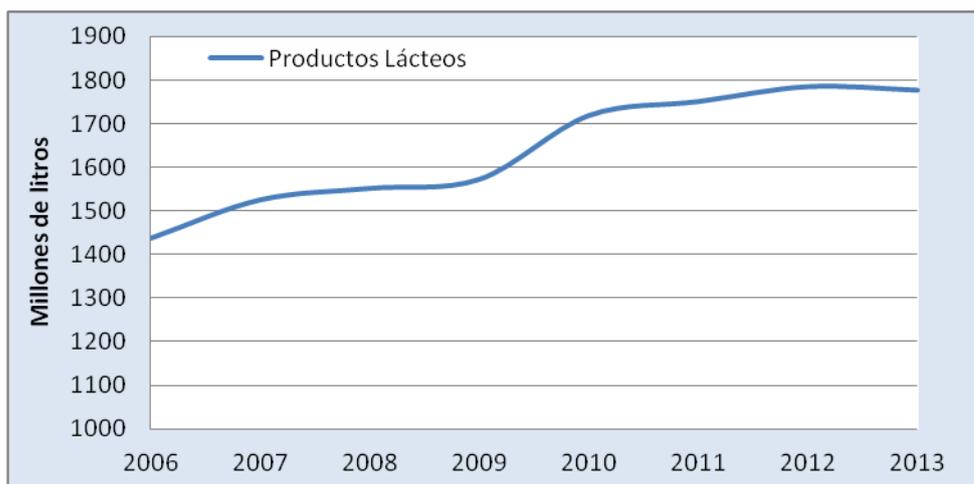
actividad citotóxica en células promielocíticas de leucemia humana (Puertollano y col., 2009). Recientemente, se ha publicado que dichos sobrenadantes de *L. plantarum* C4 son capaces de inducir necrosis en lugar de apoptosis a dosis altas en la línea celular promielocítica, demostrando las propiedades citotóxicas de los mismos en esta línea celular tumoral y abriendo la posibilidad de analizar la composición química para elucidar las moléculas bioactivas (Puertollano y col., 2013).

## 2.2. Consumo

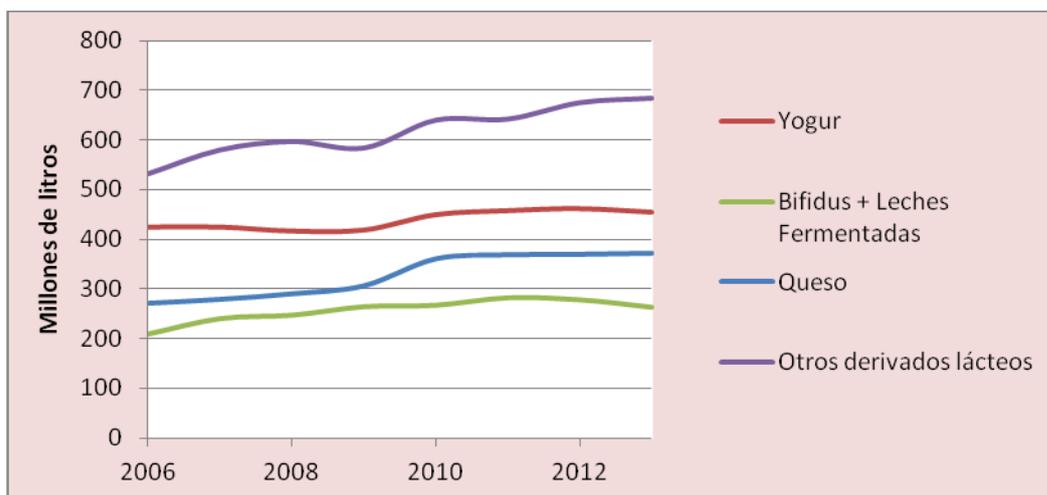
Recientemente en Europa se ha observado una disminución de productos lácteos, sobre todo de leche entera, debido principalmente al desarrollo de percepciones negativas en torno al consumo de la misma. Esta situación también afecta a la población infantil, de ahí que existan diversas campañas para concienciar a los niños sobre las ventajas del consumo de este alimento. No hay datos disponibles en cuanto al consumo de la leche de cabra y sus productos derivados.

Los datos de consumo alimentario en el hogar español en 2012, mostraron un intercambio en la compra de leche entera (-4,7%) por desnatada (+4,3%), permaneciendo estable la semidesnatada, mientras que el grupo de los derivados lácteos aumentó un 0,7% respecto al año anterior (MAGRAMA, 2012).

En los últimos años, el sector de las leches fermentadas se ha convertido en uno de los más dinámicos de la industria láctea, debido a los constantes lanzamientos que buscan adaptarse a las nuevas exigencias del consumidor y que suponen en la mayoría de los casos, una fuerte inversión en I+D+i (investigación, desarrollo e innovación), en publicidad y en nuevas tecnologías (SAGPyA, 2009). Muestra de ello es que mientras el consumo total de lácteos en la Unión Europea ha disminuido en un 25%, especialmente mantequilla, leche líquida y leches conservadas, se aprecian aumentos importantes en el consumo de leches fermentadas, quesos y postres lácteos. En España concretamente, el consumo de derivados lácteos ha experimentado un importante incremento, triplicándose en los últimos 20 años, y siendo el grupo de las leches fermentadas uno de los principales (MAPA, 2008). Ha habido un aumento en el consumo de las leches fermentadas con probióticos, mientras que el de las enriquecidas ha disminuido. Se observa no sólo en las marcas más conocidas y líderes en ventas, sino también en las marcas blancas (Aranceta y col., 2007; MERCASA, 2007). Los datos más recientes de consumo de derivados lácteos en hogares españoles se detallan en las figuras 1 y 2 (MAGRAMA, 2013).



**Figura 1.** Evolución del consumo anual de productos lácteos en los hogares españoles (MAGRAMA, 2013).



**Figura 2.** Evolución del consumo anual de los distintos tipos de derivados lácteos en los hogares españoles (MAGRAMA, 2013).

### 2.3. Interés nutricional

La leche y los productos lácteos constituyen uno de los grupos de alimentos más completos y equilibrados, ya que proporcionan un elevado contenido en nutrientes en relación con su contenido calórico. Las guías alimentarias aconsejan un consumo diario medio de 2 a 4 raciones. Sin embargo, actualmente se consumen, no sólo para satisfacer los requerimientos nutricionales de los consumidores, sino por su papel en la promoción de la salud y la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas (Nagpal y col., 2012).

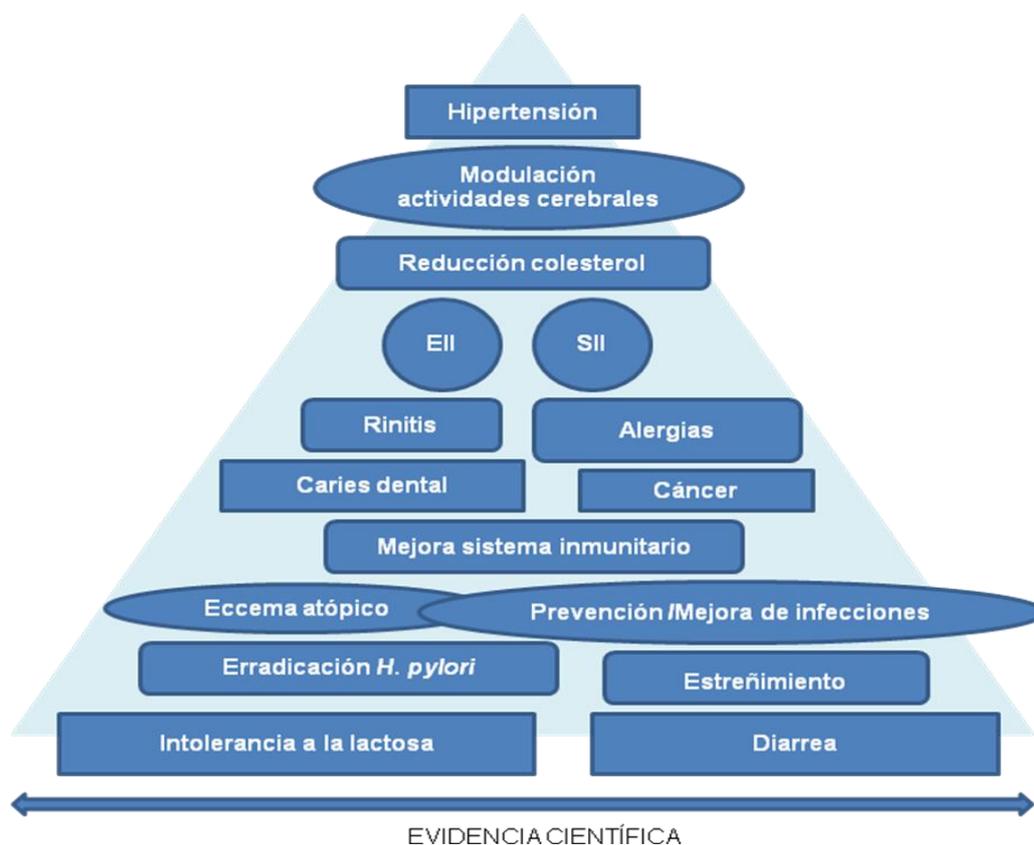
Estudios realizados en niños, adolescentes y adultos, principalmente en mujeres, muestran que un consumo adecuado de productos lácteos presenta efectos beneficiosos en la salud ósea (Caroli y col., 2011). Si se consumen con baja cantidad de grasa, junto con una alta ingesta de frutas, verduras, cereales integrales y bajo consumo de carnes, dulces y grasas, tiene efectos beneficiosos tanto en la prevención como en el tratamiento de la obesidad, las enfermedades cardiovasculares (Folsom y col., 2007) y la diabetes tipo 2 (Tremblay y col., 2009). En población adulta con sobrepeso y obesidad se ha demostrado que un consumo adecuado de leche y/o yogur aumenta la sensibilidad a la insulina y tiene efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico, marcadores de inflamación (Nikooyeh y col., 2011) y sobre la tensión arterial (Van Meijl y col., 2011).

Las conclusiones de diversos metaanálisis indican que una alta ingesta de lácteos, frente a una baja ingesta, se relaciona con una menor incidencia de enfermedad cardíaca isquémica, de infarto de miocardio, de diabetes tipo 2 (Elwood y col., 2010) y un menor riesgo de aparición de cáncer de colon (Huncharek y col., 2009).

La ingesta de leches fermentadas con probióticos tiene una serie de efectos beneficiosos adicionales ya que en los procesos de fermentación se favorece la liberación de lactoferrina, micronutrientes, esfingolípidos, componentes antimicrobianos, exopolisacáridos y péptidos bioactivos, estos últimos con un amplio espectro de propiedades funcionales como por ejemplo efectos antihipertensivos, inmunomoduladores y antioxidantes (Beermann y col., 2013). Además, los probióticos aportan propiedades saludables específicas entre las que destaca la prevención y tratamiento de la diarrea aguda o asociada al tratamiento con antibióticos (Sánchez y col., 2009), mejora en el sistema inmunitario, disminución de los síntomas de intolerancia a la lactosa, disminución de alergia en individuos susceptibles, disminución de ciertos tipos de cáncer y reducción del colesterol plasmático, mejora de las infecciones urogenitales femeninas y de las infecciones por *Helicobacter pylori* (Baró y col. 2010; Khani y col., 2012) y modulación de algunas actividades cerebrales relacionadas con el procesado de emociones y sensaciones (Legrain-Raspaud y col., 2013).

Un reciente metaanálisis indica que las leches fermentadas con probióticos tienen un efecto hipotensor tanto en sujetos hipertensos como en sujetos pre-hipertensos (Dong y col., 2013)

Todos estos efectos positivos se recogen en la figura 3. Sin embargo, Fontana y col. (2013) destacan que, incluso cuando los resultados de estudios aleatorios, controlados con placebo, confirman los beneficios de un probiótico para una indicación específica, éstos generalmente no son extrapolables a otros microorganismos probióticos, por lo que son necesarias futuras investigaciones para lograr una mayor evidencia científica.



**Figura 3.** Propiedades beneficiosas atribuidas a leches fermentadas con probióticos (Modificado de Sánchez y col., 2009). EII: enfermedad inflamatoria intestinal; SII: síndrome de intestino irritable.

### **3. LECHE DE CABRA**

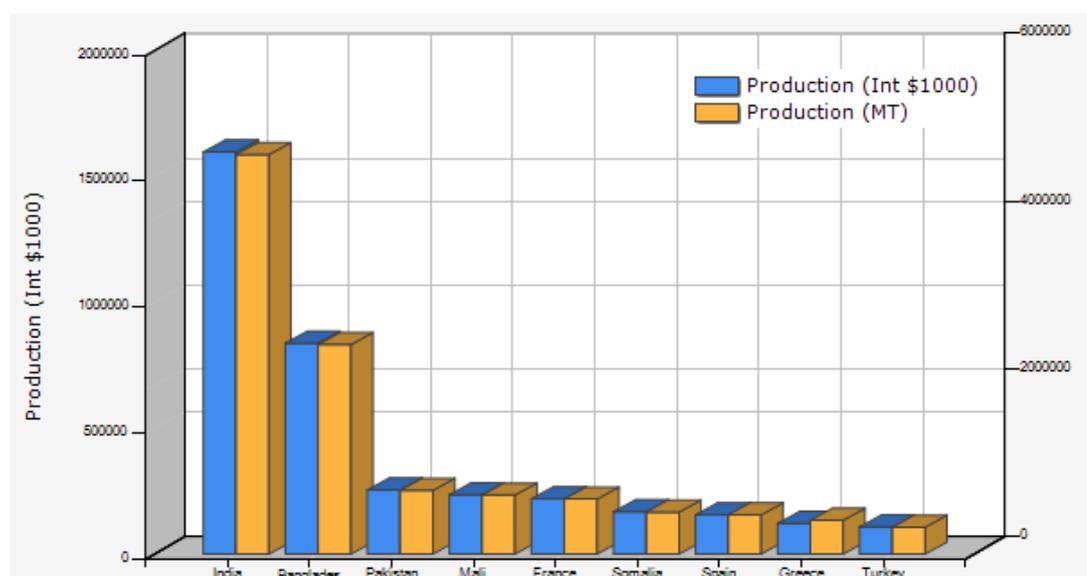




### 3.1. Producción

La contribución de la leche de cabra al bienestar económico y nutricional de la sociedad es imprescindible en muchos países en vías de desarrollo (Ribeiro y col., 2010). En las zonas más pobres de Asia, África e Iberoamérica, el ganado caprino sustenta a las poblaciones más pobres y marginales, jugando un papel social y económico muy destacado. Mientras tanto, en áreas más ricas, destaca en la producción de alimentos de una alta calidad gastronómica, como por ejemplo los quesos, especialmente en Europa.

Con respecto a la producción mundial de leche de cabra, India se sitúa a la cabeza mientras que España ocupa el séptimo puesto junto con otros países europeos como Grecia y Francia (figura 4). En la Unión Europea apenas hay unos catorce millones de cabras, pero este ganado y sus sistemas de producción están muy arraigados. La región Mediterránea produce un 16% de la leche de cabra mundial (Pandya y col., 2007).



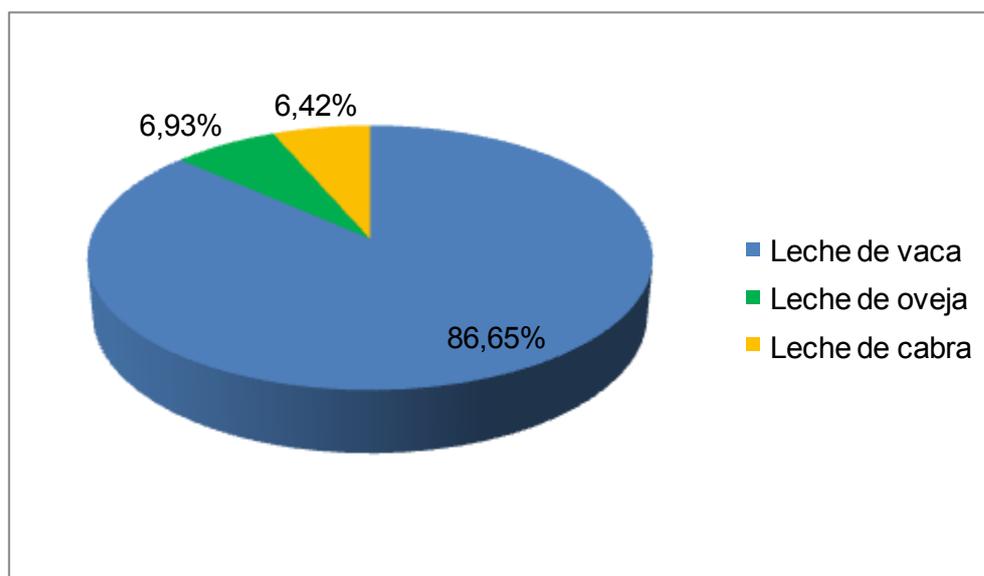
**Figura 4.** Producción media de leche de cabra en el mundo (FAOSTAT, 2011).

En España, con cerca de tres millones de cabras que producen unos 490 millones de litros de leche anuales, existe un excelente patrimonio genético, con razas autóctonas y otras ya bastante seleccionadas y productivas, coexistiendo sistemas de producción todavía muy tradicionales junto a otros más modernos y mecanizados (MAGRAMA, 2011). Asimismo, los derivados de leche de cabra están dejando de ser

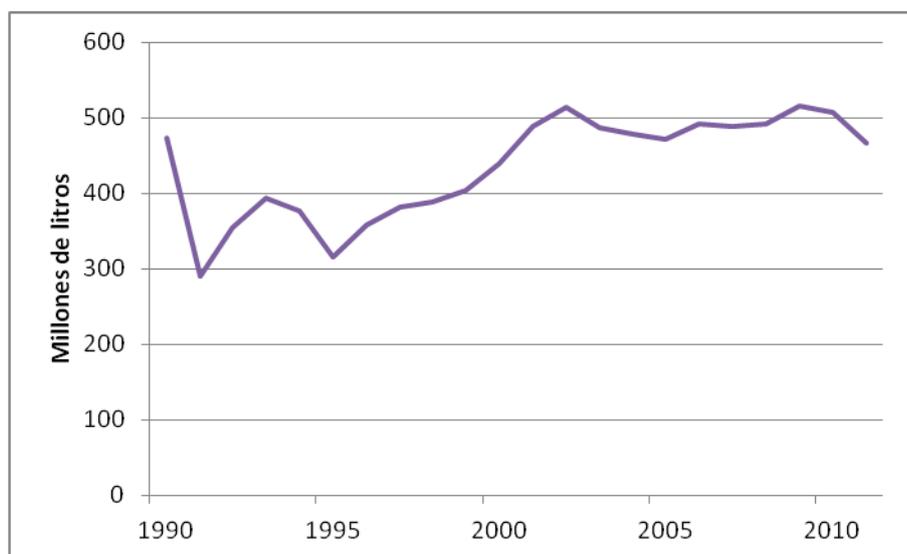
productos tradicionales locales y se está desarrollando un mercado de alimentos de calidad con alta demanda y precio.

Las zonas áridas presentan un problema común, la fragilidad en el equilibrio de sus ecosistemas y, en consecuencia, el peligro de desertización. Diversos autores han propuesto el uso ganadero, mediante sistemas extensivos o semiextensivos, con bajos aportes del exterior, basados en sus propios recursos e integrados en el medio natural, dentro de lo que se entiende como “agricultura sostenible”, seleccionando a la cabra como especie de elección por su adaptación a estas zonas, por el alto valor de su carne y leche (Sanz, 2007) y por generar trabajo, favoreciendo la estabilidad demográfica de áreas económicamente desfavorecidas.

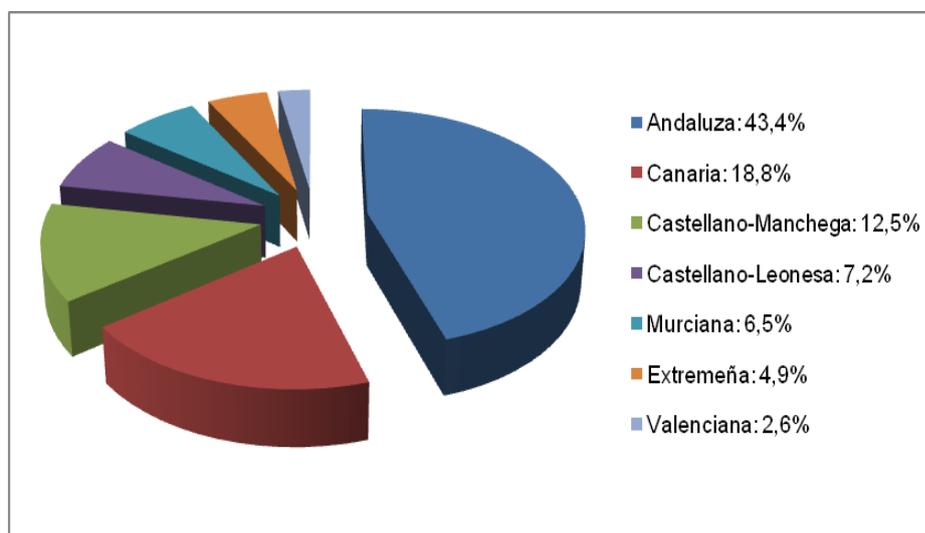
En las figuras 5 y 6 se muestran los últimos datos de producción de leche de distintas especies animales en España, publicados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2011). Andalucía es la comunidad autónoma con mayor producción de leche de cabra y representa casi la mitad de la producción nacional (figura 7).



**Figura 5.** Producción de leche de distintas especies animales en España (MAGRAMA, 2011).



**Figura 6.** Producción de leche de cabra en España. Período 1990-2010 (MAGRAMA, 2011).



**Figura 7.** Producción de leche de cabra en distintas comunidades españolas (MAGRAMA, 2011).

### 3.2. Interés nutricional

La leche de cabra es un alimento de muy fácil digestión y tolerancia y con un alto valor nutricional. Además, posee notables ventajas con respecto a otras leches de consumo. Los componentes mayoritarios de la leche de diferentes especies se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Composición media de la leche de cabra, oveja, vaca y humana (Slacanac y col., 2010).

Composición (g/100g)	Cabra	Oveja	Vaca	Humana
<b>Sólidos totales</b>	11,94	19,00	12,89	12,74
<b>Lactosa</b>	4,45	4,90	4,70	6,90
<b>Proteína</b>	3,30	6,20	3,33	1,20
<b>Caseína</b>	2,25	4,20	2,70	0,40
<b>Albúmina, globulina</b>	0,75	1,00	0,65	0,70
<b>Nitrógeno no proteico</b>	0,40	0,80	0,20	0,50
<b>Grasa</b>	3,35	7,90	3,85	4,00
<b>Cenizas</b>	0,80	0,90	0,73	0,30
<b>kcal (kcal/100 mL)</b>	70	105	69	68
<b>Colesterol</b>	0,010	-	0,013	-

- Datos no disponibles

Las diferencias fisiológicas y anatómicas de las distintas especies se traducen en diferencias en la composición de la leche (Haenlein, 2004), que está influenciada por la raza, factores genéticos, fisiológicos, ambientales, tipo de alimentación y período de lactación. La composición de la leche de cabra de diferentes razas y países se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Composición de la leche de cabra de diferentes razas y países (Raynal-Ljutovac y col., 2008).

País	Raza	Sólidos totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Caseína (%)	Lactosa (%)	Cenizas (%)
Reino Unido	Saanen británica	11,6	3,48	2,61	2,30	4,30	0,80
Reino Unido	Nubian	-	4,94	3,60	-	4,51	-
Francia	Alpina/Saanen	-	3,60	-	-	-	-
Italia	Sardinia	-	5,10	3,90	-	-	0,71
Grecia	Local	14,8	5,63	3,77	3,05	4,76	0,73
Chipre	Damascus	13,2	4,33	3,75	2,97	-	0,83
España	Murciano-Granadina	-	-	4,09	3,21	-	-

- Datos no disponibles

→ *Hidratos de carbono*

El contenido en lactosa es ligeramente inferior al de la leche de vaca y por tanto, la leche de cabra presenta menos problemas asociados con la intolerancia a la lactosa (Slacanac y col., 2010). Su principal diferencia con ésta es la presencia de oligosacáridos. En la leche de cabra se han identificado oligosacáridos con estructuras muy similares a los de la leche humana, en menor concentración y con un alto contenido en galactosa, importante para el desarrollo cerebral en las primeras etapas de la vida (Martínez-Férez y col., 2005; Hijano, 2010). En ratas con colitis inducida se ha demostrado que los oligosacáridos reducen la inflamación (Lara-Villoslada y col., 2006) por lo que podrían ser una alternativa eficaz a las terapias utilizadas en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (Daddaoua y col., 2006).

→ *Proteínas*

La leche de cabra contiene proteínas de alta calidad nutricional y fácil absorción. La menor proporción de caseínas y mayor proporción de proteínas séricas, en comparación con la leche de vaca, contribuye a su mejor digestibilidad (Olalla y col., 2009; López-Aliaga y col., 2010). Además, esta leche forma en el estómago un coágulo más pequeño, blando y fragmentable que favorece la acción de las proteasas digestivas (Haenlein, 2004; Park y col., 2006).

La estructura de sus proteínas le confiere características hipoalergénicas. Un elevado porcentaje de personas con alergia a la leche de vaca (40-100%, según diversos estudios), toleran la leche de cabra (Slacanac y col., 2010). La leche de cabra es por tanto, una alternativa a la de vaca en síndromes de malabsorción y problemas de hipersensibilidad a las proteínas de la leche de vaca, no sólo en lactantes, sino también en niños y adultos (Lara-Villoslada y col., 2004). Recientemente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha autorizado la utilización de la proteína de la leche de cabra como fuente proteica para la elaboración de fórmulas infantiles y fórmulas de continuación (EFSA, 2012).

La leche de cabra posee cantidades adecuadas de aminoácidos esenciales, a excepción del triptófano. La taurina, considerada como un aminoácido no esencial (se produce a partir de cisteína) es el que se encuentra en mayor proporción, con un contenido muy similar al de la leche materna (9 mg/100 mL); podría tener un papel importante en la visión, función cerebral y cardiaca, procesos de detoxificación y asimilación de grasas (Raynal-Ljutovac y col., 2008).

El contenido en compuestos nitrogenados no proteicos (poliaminas, glutamina y nucleótidos), difiere del de la leche de vaca y es muy similar al de la leche humana, por lo que la leche de cabra se puede considerar como una fuente natural de dichos compuestos (Prosser y col., 2008).

Aunque el estudio de los efectos biológicos de los péptidos bioactivos obtenidos a partir de caseínas y proteínas séricas se ha centrado principalmente en la leche de vaca y sus derivados (Ricci y col., 2010), en los últimos años se han identificado péptidos antihipertensivos en la leche de cabra (Geerlings y col., 2006; Espejo-Carpio y col., 2013) y en sus derivados (Quiros y col., 2005) y péptidos con actividad antibacteriana (Robiataille y col., 2012).

### → *Grasa*

Uno de los aspectos más interesantes en la calidad nutricional, sensorial y tecnológica de la leche de cabra se refiere a la naturaleza de su grasa. Los triglicéridos representan casi el 95% de los lípidos totales, mientras que el contenido medio en leche de vaca es del 98% (Baró y col., 2010; Hijano, 2010). La leche de cabra tiene un mayor contenido en ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico y ácido caproico) y en ácidos grasos de cadena media (ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico y ácido mirístico) que la leche de vaca, con valores medios de 20% frente al 6% en el caso de los ácidos grasos de cadena corta y de 38% frente al 18% para los ácidos grasos de cadena media (Slacanac y col., 2010).

Los glóbulos grasos de la leche de cabra se encuentran en menor proporción y son más pequeños que los de la leche de vaca; esto facilita una mejor dispersión y una distribución más homogénea, por lo que mejora la digestibilidad. Además, los ácidos grasos de cadena corta y media, presentan mejor digestión y absorción que los ácidos grasos de cadena larga. Una vez en el enterocito son transportados, vía porta, directamente al hígado, donde se utilizan para obtener energía de forma rápida. Estas características metabólicas determinan que la grasa de la leche de cabra tenga utilidad terapéutica en casos de insuficiencia intestinal, biliar o pancreática (Silanikove y col., 2010). Se ha demostrado experimentalmente que su ingesta contribuye a la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos (López-Aliaga y col., 2005), y a la regulación del peso corporal (Lee y col., 2012).

El contenido en ácido linoleico conjugado es importante, si bien éste se puede modificar, al igual que el de los demás ácidos grasos, modificando la dieta del animal (Haro y col., 2006; De la Fuente y col., 2009).

La composición en ácidos grasos de la leche de cabra es también la responsable de su flavor característico.

→ *Contenido mineral*

Hoy día se considera la leche de cabra de mejor calidad que la de vaca, no sólo por los minerales que aporta, sino también por su utilización en el organismo, tanto en procesos digestivos como metabólicos (López-Aliaga y col., 2003; Alférez y col., 2006).

La leche de cabra posee cantidades más altas de Ca, P, K, Mg y Cl, y más bajas de Na, Fe, Se, S, Mo y Zn, en comparación con la de vaca (Sanz y col., 2009). Cabe destacar el Ca y el P de alta biodisponibilidad, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. Además, la leche de cabra favorece la absorción de Fe y su depósito en órganos diana (López-Aliaga y col., 2009).

→ *Vitaminas*

En cuanto a la composición vitamínica de la leche de cabra, su bajo contenido en ácido fólico es prácticamente su único inconveniente. Contiene niveles más altos de tiamina, riboflavina y niacina que la leche de vaca, pero no de B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>. El contenido en vitamina D también es superior en la leche de cabra. Otra característica destacable es su elevado contenido en vitamina A y, a diferencia de la leche de vaca, no contiene precursores de dicha vitamina, sino que se presenta como tal (Díaz-Castro y col., 2009).



## 4. LECHES DE CABRA FERMENTADAS





Desafortunadamente, existen muchas dificultades tecnológicas asociadas a la producción de leches fermentadas de cabra con buenas propiedades organolépticas, muchas de ellas relacionadas con su composición (Domagala, 2009).

La consistencia de estos fermentados lácteos se considera uno de los puntos críticos (Farnsworth y col., 2006). La leche de cabra tiene un contenido en caseína ligeramente más bajo que la de vaca, con una baja proporción de  $\alpha_{s1}$ -caseína, y un mayor grado de dispersión de las micelas (Vegarud y col., 1999), lo que provoca que el coágulo que se obtiene sea mucho más débil (Novakovic y col., 1997, 1998). Aún así, existe cierta controversia en cuanto a la leche caprina, pues también se ha demostrado que en yogures producidos con mezclas de leche de cabra y vaca, la sinéresis disminuye con la adición de más leche de cabra (Rojas-Castro y col., 2007; Vargas y col., 2008).

Se están llevando a cabo diversas estrategias para mejorar la calidad sensorial de estos productos. El contenido en sólidos no grasos se aumenta mediante distintos procedimientos como concentración de la leche de partida con membranas, adición de leche desnatada en polvo y concentrados de proteínas del suero lácteo, adición de estabilizadores como pectinas e inulina, y empleo de bacterias ácido-lácticas productoras de exopolisacáridos (Martín-Diana y col., 2003; Herrero y col., 2006; Tratnik y col., 2006; Stack y col., 2010).

La concentración de la leche de partida con métodos como la ultrafiltración aporta mejores propiedades organolépticas, sobre todo en cuanto a mejor textura y menor sinéresis, frente a productos con adición de leche en polvo, ya que además ésta puede causar un deterioro o modificación del olor y el sabor (Mehaia y col., 1998). Se ha observado que los fermentados lácteos elaborados con leche de cabra ultrafiltrada y con adición de microorganismos probióticos tienen mejores propiedades organolépticas (Domagala y col., 2008, 2012).

La naturaleza de las caseínas es importante respecto de la resistencia del gel; las  $\beta$ -caseínas que predominan en la leche de cabra originan un gel más fuerte que el obtenido con la leche de vaca (Robinson, 1995).

El punto isoeléctrico de la caseína bovina se sitúa en torno a pH 4,6, mientras que las proteínas caprinas lo alcanzan a pH 4,2. Cuando se alcanza este pH, es cuando se produce la coagulación de la mayor parte de las caseínas, llevando a la formación del gel y a una mejora en la retención del suero.

El desarrollo de leches fermentadas de cabra adicionadas de microorganismos probióticos ha sido recomendado en el campo de la producción de fermentados lácteos con efectos terapéuticos (Martín-Diana y col., 2003). Es por ello que, al igual que para la leche de vaca, en diversos estudios se promueve el crecimiento de bacterias probióticas en la leche de cabra para conseguir una mejora en la funcionalidad de sus productos fermentados (Martín-Diana y col., 2003; Farnsworth y col., 2006; Kongo y col., 2006; Tratnik y col., 2006; Kehagias y col., 2008).

## 5. OBJETIVOS





De todo lo expuesto se deduce que:

- El interés y los beneficios saludables de la leche de cabra, frente a la de vaca, están bien demostrados: presencia de oligosacáridos similares a los de la leche humana, mejor digestibilidad de la grasa, menor alergenicidad a las proteínas y mayor biodisponibilidad de minerales.
- La conveniencia de las leches fermentadas también es bien conocida, en cuanto a que se minimizan problemas de intolerancia a la lactosa, tienen notables efectos biológicos, se pueden obviar problemas de aceptabilidad (máxime si se parte de leche desnatada), se mejora la digestibilidad de la leche y son vehículo ideal para la incorporación de probióticos.
- La cepa *L. plantarum* C4 cumple los criterios para la selección de bacterias probióticas, posee propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras. Además, la leche desnatada puede ser un vehículo apropiado para su administración.
- En cuanto al proceso tecnológico de obtención de leches fermentadas, diversos estudios reflejan las ventajas de la ultrafiltración frente a la adición de leche en polvo, aportando un producto con mejor calidad sensorial y nutricional.

Por tanto, en este primer capítulo, nos planteamos los siguientes objetivos:

- ✓ Diseñar y desarrollar una leche de cabra fermentada desnatada, añadiendo un microorganismo con efecto probiótico, concretamente la cepa *L. plantarum* C4, y aplicando un proceso de ultrafiltración para incrementar el extracto seco magro de la leche de partida.
- ✓ Llevar a cabo su caracterización microbiológica, físico-química y de textura.



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS





## 6.1. Instrumentación

Autoclave Autester Mod. 437-G. JP Selecta (Barcelona, España).

Balanza de precisión, Series 260, Precisa Instruments AG (Dietikon, Suiza).

Baño de agua termostatzado con agitación, Thermolab® GFL 1086 (BurgWedel, Alemania).

Cántaras de acero inoxidable.

Centrífuga termostatzada Sigma 2-16PK, Sartorius (Alemania).

Desnatadora compuesta por platillos de acero inoxidable, Suministros Químicos Arroyo (Santander, España).

Incubador, JP Selecta (Barcelona, España).

Membrana de ultrafiltración de 50 kDa, Sartorius Stedim Biotech (Alemania).

Micropipetas de 10-50  $\mu$ L, 50-200  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L, Boeco (Alemania).

Placas estériles de 96 pocillos, Nunclon Surface, Nunc™ (Roskilde, Dinamarca).

Sonda de pH y temperatura, Crison pH-Meter Basic 20, Crison Instruments, S.A. (Barcelona, España)

Thermomix TM 31, Vorwerk (Madrid, España).

Viscosímetro Brookfield, modelo DV-II+, Brookfield Engineering (Harlow, Reino Unido).

Vortex, Cleaver Scientific Ltd (Rugby, Reino Unido).

## 6.2. Reactivos

Agar *Lactobacillus plantarum* selective medium (LPSM).

Fermentos lácticos YO-MIX 495 LYO 100 DCU (Starter). *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, Danisco (Francia).

Lactobacilli MRS agar (MRS), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, Estados Unidos).

Lactobacilli MRS broth (MRS-broth), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, Estados Unidos).

Phosphate Buffered Saline tablets (PBS), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Estados Unidos), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Tryptic Soy Agar (TSA), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, Estados Unidos).

### 6.3. Proceso de elaboración de la leche fermentada

La elaboración experimental de la leche fermentada se realizó a pequeña escala, en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada, a partir de leche cruda de cabra de la raza Murciano-granadina procedente de una explotación ganadera situada en Granada (España).

#### a) Recogida y estandarización de la leche

- Recogida. Tras el ordeño, la leche de cabra se almacenó inmediatamente en un tanque de refrigeración a 4°C con agitación suave, manteniendo dicha temperatura hasta su procesado. El transporte al laboratorio se realizó antes de 2 h tras el ordeño, en cántaras estériles de 5 L de capacidad, manteniendo la cadena de frío. Se realizó el análisis organoléptico pertinente para asegurar la ausencia de olores y sabores extraños.
- Desnatado. La leche se homogeneizó y se calentó previamente hasta 30-35°C, temperatura óptima para el desnatado. Se desnataron los 5 L con una centrífuga desnatadora compuesta por platillos de acero inoxidable, obteniendo un 80% de volumen de leche y un 15% de nata. El contenido graso de la leche y de la nata se comprobó mediante el método de Gerber.
- Concentración de la leche. Con el fin de concentrar la leche desnatada y aumentar su extracto seco, se ultrafiltró utilizando una membrana de 50 kDa, separando leche concentrada y suero. También se prepararon leches fermentadas con adición de leche en polvo para estudiar posibles diferencias de textura y valor nutricional.

- b) Pasteurización. Se calentó la leche a 80°C durante 30 min, controlando siempre la temperatura con una sonda térmica. Este tratamiento térmico se realizó con el fin de eliminar microorganismos patógenos y reducir la población microbiana banal para que no interfiera en el proceso de fermentación. Su eficacia se comprobó mediante las pruebas de la peroxidasa y la fosfatasa:

La leche cruda contiene la enzima **peroxidasa**, que se inactiva a 80°C. La presencia de la misma se puede detectar por su capacidad de descomposición del agua oxigenada liberando oxígeno atómico capaz de fijarse a una sustancia oxidable, como el guayacol, dando un producto de oxidación color salmón. Para comprobar que el proceso de pasteurización se realizó correctamente, se dispusieron en un tubo 2 mL de leche, 2 mL de solución saturada de guayacol y una gota de agua oxigenada, se agitó y se mantuvo durante 1 min a 20-30°C. No se observó ningún cambio en la coloración, por lo que se consideró que la leche había sido calentada correctamente a 80°C.

La **fosfatasa**, enzima presente en la leche cruda, es progresivamente inactivada por calentamiento superior a 60°C. La presencia de fosfatasa activa se pone en evidencia por sus propiedades de liberar por hidrólisis el p-nitrofenol, compuesto coloreado, a partir del sustrato p-nitrofenilfosfato disódico. Para su comprobación, se dispusieron en un tubo 2 mL de leche y 2 mL del reactivo de Ashaffenburg et Mullen, se agitó y se mantuvo durante 30 min a 37°C. No se desarrolló coloración amarilla, lo cual confirmó la ausencia de fosfatasa activa.

- c) Enfriamiento de la leche. Una vez finalizado el tratamiento térmico y siempre en condiciones de asepsia, la leche se dividió en alícuotas de 1 L y se enfrió hasta la temperatura óptima para el desarrollo de las bacterias lácticas propias del yogur, es decir, 42°C. Además, se efectuó una prueba paralela enfriando la leche hasta 37°C.
- d) Inoculación. A 42°C y 37°C, se inocularon los microorganismos responsables de la fermentación y se elaboraron 2 tipos de leches fermentadas:
- *Leche fermentada control*, con los microorganismos propios del yogur (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*). Éstos, a los que denominamos starter, se añadieron en una concentración de 0,032 g/L, indicada en el protocolo de dicho cultivo para conseguir una densidad inicial de  $10^6$  ufc/mL.
  - *Leche fermentada experimental*, añadiendo los microorganismos propios del yogur y *L. plantarum* C4. Éste se sembró el día anterior en agar MRS y se incubó a 37°C durante 24 h. Para proceder a la inoculación, se preparó una suspensión del microorganismo en PBS a concentración de  $10^8$ - $10^9$  ufc/mL, se centrifugó dicha suspensión a 3500 rpm durante 10 min, se desechó el

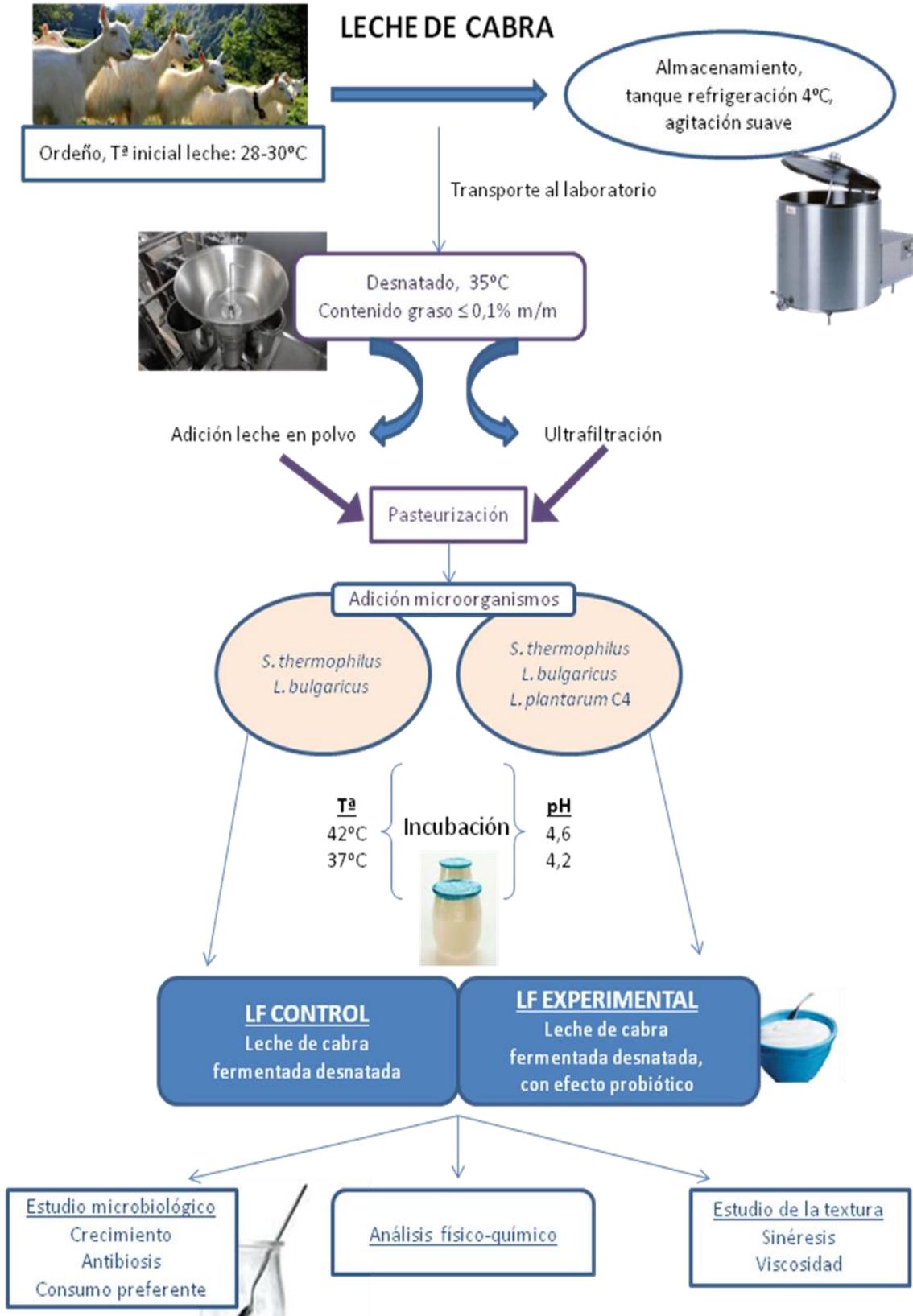
sobrenadante y se resuspendió el “pellet” de microorganismos en 10 mL de leche, consiguiendo así una concentración de  $10^7$ - $10^8$  ufc/mL. Esos 10 mL se inocularon en 1 L de leche, con lo que la concentración inicial de *L. plantarum* C4 en la leche fue de  $10^5$ - $10^6$  ufc/mL. Además, se efectuó una prueba paralela inoculando el microorganismo a mayor concentración. Para ello, la siembra del día anterior se realizó en 300 mL de MRS-broth, incubando a 37°C en agitación, tras centrifugar y resuspender el “pellet” en 10 mL de leche se consiguió una suspensión de  $10^{10}$ - $10^{11}$  ufc/mL, de forma que al añadirlos a 1 L de leche, se obtuvo una concentración inicial de  $10^8$ - $10^9$  ufc/mL. El starter se añadió de igual manera que para la leche fermentada control.

- e) Incubación. Tras la inoculación y homogeneización de las muestras, se repartió cada litro en frascos de vidrio de 200 mL, para elaborar así 5 alícuotas de leche fermentada control y 5 de leche fermentada experimental. Todas se incubaron a 42°C y 37°C durante 6-8 h, hasta que se alcanzó el pH deseado, éste fue 4,6 como marcan las normas de elaboración de leches fermentadas de vaca. Además, se elaboraron otras leches fermentadas repitiendo todo el proceso pero manteniendo la incubación hasta pH 4,2 para observar si así se conseguía una mejora en las características de textura del producto.

El pH y la temperatura se midieron en los tiempos 0 h, 4 h, 6 h y 8 h. Además, también se tomaron alícuotas para estudiar y controlar el crecimiento de los distintos microorganismos, así como las interacciones entre ellos.

- f) Enfriamiento y conservación del producto final. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y alcanzado el pH deseado se procedió al enfriamiento rápido de las leches fermentadas en cámara fría (4°C) para detener el proceso fermentativo y el crecimiento microbiano. Éstas se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de los análisis.

La figura 8 muestra un esquema de la elaboración de la leche de cabra fermentada desnatada con efecto probiótico, destacando los diferentes parámetros evaluados y condiciones aplicadas durante el diseño y desarrollo de la misma.



**Figura 8.** Esquema de la elaboración de la leche de cabra fermentada desnatada, con efecto probiótico. LF: leche fermentada.

## 6.4. Estudio microbiológico

Con el objetivo de caracterizar microbiológicamente nuestro producto, se estudiaron el crecimiento y las interacciones entre la cepa probiótica *L. plantarum* C4 y las cepas del starter (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*), pues la elaboración de una leche fermentada con efectos probióticos requiere compatibilidad entre las distintas bacterias envueltas en el proceso de fermentación.

Para ello, se realizaron contajes de los microorganismos viables a distintos tiempos del proceso de fermentación y se hicieron ensayos de antibiosis entre las tres cepas utilizadas para la elaboración de la leche fermentada.

### • Evaluación del crecimiento de los cultivos

Para proceder al recuento de microorganismos viables, se tomaron alícuotas del producto a distintos tiempos del proceso de fermentación (0 h, 4 h, 6 h, 8 h). Se prepararon diluciones seriadas de la leche fermentada en PBS ( $10^1$ - $10^9$ ), se sembraron las mismas en placas de agar MRS y TSA para el crecimiento de todos los microorganismos, y en LPSM (*L. plantarum* selective medium) para el crecimiento selectivo de la cepa *L. plantarum* C4 y se incubaron a 37°C durante 24-48 h, tras lo cual se procedió al recuento. En la tabla 3 se muestra la composición del medio LPSM, diseñado y desarrollado con anterioridad en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada (Bujalance y col., 2006).

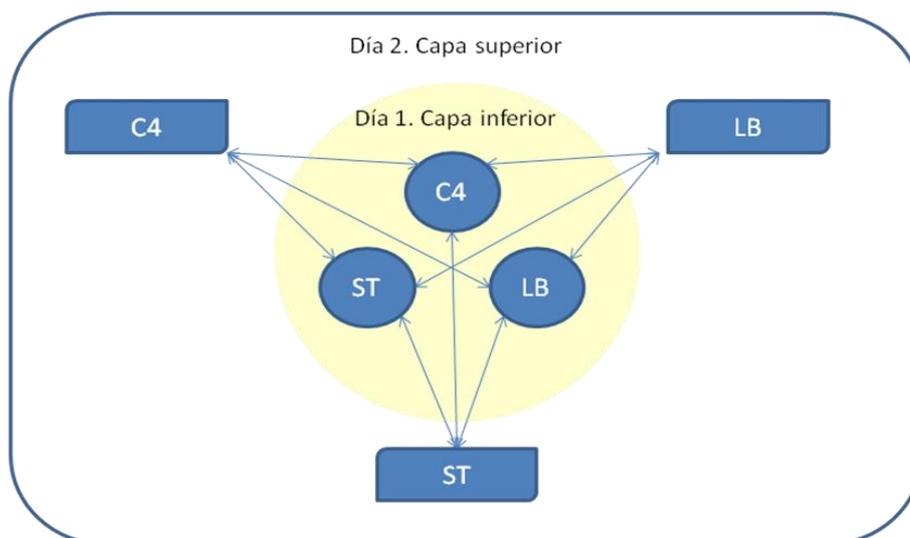
**Tabla 3.** Composición del medio LPSM (*L. plantarum* selective medium).

	g/L
Bacto proteosa peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Sorbitol	20
Citrato amónico	2
Acetato sódico	5
Fosfato potásico	2
Sulfato magnésico	0,1
Sulfato manganésico	0,05
Bacto agar	15
Púrpura de bromocresol	0,02
Ciprofloxacino	0,004 (2 mg/mL)

### • Ensayos de antibiosis

Se realizaron ensayos de antibiosis mediante el “spot test” en placas de agar MRS y TSA, para evaluar la capacidad de producción de sustancias inhibitoras del crecimiento. Este test consistió en realizar una descarga directa de cada cepa sobre placas de MRS y TSA y cubrirlas con otra capa de agar TSA conteniendo otra cepa, de forma que todas ellas se enfrentaron entre sí. La capa superior fue siempre de agar TSA y para la inferior se ensayó tanto MRS como TSA. Por tanto, se evaluaron 9 combinaciones con ambas capas de TSA y otras 9 con la capa inferior de MRS y la superior de TSA (figura 9).

Para la realización de dicho ensayo, se siguió el método descrito por Jacobsen y col. (1999) con algunas modificaciones. El día previo al ensayo se realizaron siembras de las cepas en tubos de agar MRS y se llevaron a incubación a 37°C durante 24 h. Para proceder al experimento, siempre en condiciones de esterilidad, se prepararon suspensiones en PBS de las cepas cuya capacidad de antibiosis se quería estudiar y se ajustaron por turbidez a  $10^{10}$  bacterias viables por mL. Se sembraron 10  $\mu$ L de estos inóculos en el centro de 9 placas de MRS y 9 placas de TSA, que se llevaron a incubación, para obtener una masa localizada de crecimiento bacteriano. El segundo día, se prepararon suspensiones de las bacterias indicadoras de antibiosis en PBS, que se ajustaron por turbidez hasta una concentración aproximada de  $10^{10}$  bacterias viables por mL. Se tomaron 100  $\mu$ L de suspensión y se llevaron a tubos estériles que contenían 10 mL de agar TSA mantenidos a sobrefusión (45-50°C). Estos tubos se homogeneizaron por rotación y rápidamente se vertieron cuidadosamente sobre las placas de agar MRS y TSA donde había crecido la cepa cuya capacidad de antibiosis se quería evaluar, siempre enfrentando cada cepa con ella misma y con las otras dos. De esta forma se obtuvo en las placas una doble capa: la inferior, de agar MRS o TSA, conteniendo en su superficie la masa de la bacteria productora de antibiosis, y la superior de agar TSA, conteniendo el inóculo de la bacteria indicadora de antibiosis. Una vez gelificada la capa superior, las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 h para permitir el crecimiento de la cepa indicadora, que enturbiará la capa superior de medio, excepto alrededor de la cepa productora, en caso de que haya antibiosis. Transcurrido este tiempo, se examinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento de la bacteria indicadora en torno al crecimiento de la bacteria productora de antibiosis y se procedió, en caso de inhibición, a la medida de los halos.



**Figura 9.** Combinaciones estudiadas en los ensayos de antibiosis.

C4: *L. plantarum* C4

LB: *L. bulgaricus*

ST: *S. thermophilus*

#### •Consumo preferente

Se tomaron alícuotas del producto tras 3, 4, 5 y 6 semanas desde la elaboración del mismo y se realizó un recuento microbiano mediante la preparación de diluciones seriadas de la leche fermentada en PBS ( $10^1$ - $10^9$ ), siembra en placas de agar MRS y TSA para el crecimiento de todos los microorganismos, y en LPSM para el crecimiento selectivo de la cepa *L. plantarum* C4 e incubación a 37°C durante 24-48 h, tras lo cual se procedió al recuento. El objetivo fue estudiar la vida media de la leche fermentada, es decir, comprobar que los microorganismos seguían siendo viables y que estaban a la misma concentración, pues la supervivencia de dichos microorganismos durante la refrigeración proporcionará a la leche fermentada los efectos beneficiosos basados en las altas concentraciones de probióticos (Kongo y col., 2006).

## 6.5. Análisis físico-químico

Se realizó la caracterización físico-química, tanto de la leche de partida como de las leches fermentadas control y experimental, en la empresa Biot, asociada al proyecto de investigación que sustenta este trabajo. Los análisis se llevaron a cabo siguiendo los métodos oficiales (AOAC, 2006).

- **pH**

Esta medida se realizó mediante lectura directa en pH-metro a una temperatura de 25°C.

- **Acidez**

La acidez, expresada en gramos de ácido láctico por 100 mL de leche o leche fermentada, se determinó mediante titulación potenciométrica con hidróxido de sodio hasta viraje, utilizando fenolftaleína como indicador.

- **Densidad**

Se utilizó un lactodensímetro de Quevenne contrastado para determinar el peso específico de la leche, en comparación con el del agua. Para ello, se vertió la leche a 15°C en una probeta ligeramente inclinada para evitar la formación de espuma, llenándose completamente, de forma que al introducir el lactodensímetro se provocara un desbordamiento de la leche eliminando así de la superficie de la leche los indicios de espuma. Se efectuó la lectura de los grados Quevenne correspondientes a la línea inmediatamente superior a la parte más alta del menisco.

La temperatura de la leche permaneció entre 13 y 18°C y, en el caso de que la leche no estuviera a 15°C, el peso específico se corrigió sumando o restando 0,2 a los grados Quevenne leídos por cada grado centígrado superior o inferior a 15°C, respectivamente.

El grado Quevenne representa la diferencia entre el peso específico y la unidad, multiplicando el resultado por 1000. El efecto Recknagel se eliminó tras mantener la leche un mínimo de 12 horas a 4-5°C.

### • Grasa

Para la determinación de la materia grasa se siguió el método de Gerber, mediante el cual se produce la liberación total de grasa de la muestra por centrifugación en un butirómetro, previo ataque con ácido sulfúrico de los elementos de la leche exceptuando la materia grasa. La separación se facilita con adición de una pequeña cantidad de alcohol isoamílico.

Se agregaron a un butirómetro 10 mL de  $H_2SO_4$ , 11 mL de leche y 1 mL de alcohol isoamílico, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 1100 rpm y a una temperatura de  $65 \pm 2^\circ C$ , tras lo cual se procedió a la lectura del porcentaje de materia grasa.

Este procedimiento varía en el caso de las leches fermentadas, por lo que se realizó una adaptación de la técnica oficial que consistió en pesar 50 g de leche fermentada y diluirla a 100 mL con agua destilada, agitando para homogeneizar. Una vez preparada esta disolución, se siguió el procedimiento descrito para la leche.

### • Lactosa

El contenido de lactosa en leche se determinó mediante el método oficial de la cloramina T, que determina el contenido en lactosa monohidratada, una vez desproteinizada la leche, mediante una valoración por retroceso. Para ello, se precipitan las proteínas con ácido túngstico y a una cierta cantidad de filtrado se le añade cloramina T y KI. La cantidad de cloramina T que no reacciona con la lactosa, lo hace con el yoduro, liberando  $I_2$  que se titula con una disolución de  $Na_2S_2O_3$ .

Se pusieron 10 mL de leche en un matraz aforado de 100 mL, se añadieron 25 mL de agua destilada y 40 mL de ácido túngstico, se enrasó con agua y, tras un reposo de 30 minutos, se filtró. Se dispusieron 10 mL de filtrado en un matraz erlenmeyer, añadiendo 5 mL de KI al 10% y 20 mL de cloramina T 0,04 N, tras lo que se mantuvo tapado y en oscuridad durante una hora y media. Transcurrido este tiempo, se añadieron 5 mL de la disolución de HCl 2 N y se procedió a una valoración con una disolución de tiosulfato 0,04 N, añadiendo hacia el final de la titulación dos o tres gotas de la disolución de almidón. Paralelamente, se hizo un ensayo en blanco con 10 mL de agua destilada en lugar del filtrado.

Los resultados se expresaron como g lactosa / 100 mL de leche. Para calcular el contenido en lactosa se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Eq. Lactosa} = \text{Eq. Cloramina T consumidos}$$

$$\text{g lactosa / 100 mL leche (desnatada)} = (n-n') 0,72 \times 0,996$$

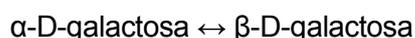
Donde,

$n$  = mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  gastados en el ensayo en blanco

$n'$  = mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  gastados para la leche

0,996 = factor experimental de corrección debido a la precipitación de las proteínas para la leche desnatada.

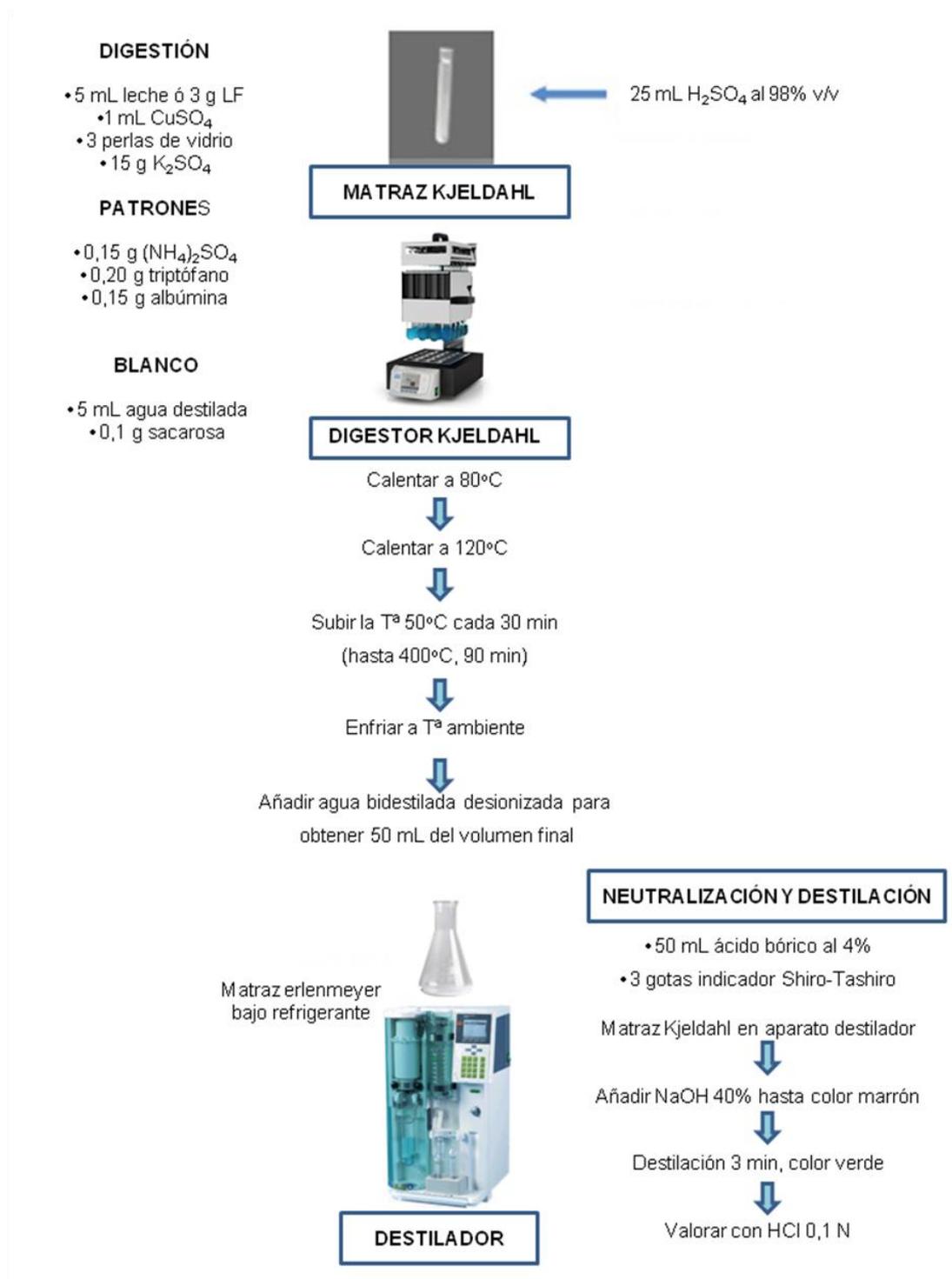
En el caso de las leches fermentadas, la lactosa se determinó mediante test enzimático, en el que la ésta es hidrolizada a D-glucosa y D-galactosa por acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa a pH 5. La interconversión de las formas  $\alpha$ - y  $\beta$ - de D-galactosa es catalizada por la galactosa mutarotasa. La  $\beta$ -D-galactosa es oxidada por  $\text{NAD}^+$  a ácido D-galactónico en presencia de  $\beta$ -galactosa deshidrogenasa a pH 8,6, formándose en esta reacción una cantidad NADH que es estequiométrica con la cantidad de lactosa. Éste se mide por el aumento de la absorbancia a 340 nm.



#### • Proteínas

La determinación de proteínas en las muestras se realizó siguiendo el método Kjeldahl. El contenido en proteína es el resultado de multiplicar el contenido en nitrógeno, determinado por el procedimiento Kjeldahl, por 6,38 como factor de conversión del nitrógeno en proteína para leche y productos lácteos.

El procedimiento para la determinación de proteínas con dicho método se esquematiza en la figura 10.



**Figura 10.** Esquema del método Kjeldahl para la determinación de proteínas en leche y leche fermentada (LF).

## 6.6. Estudio de la textura

La reología es la ciencia que estudia la deformación de un cuerpo sometido a fuerzas externas. Su estudio es esencial en muchas industrias, incluyendo las de alimentación, y destacando las industrias de productos lácteos, pues la apariencia, textura y consistencia de éstos son importantes propiedades a tener en cuenta para que el producto sea del agrado del consumidor.

Es por ello que se estudió el comportamiento reológico de la leche fermentada, concretamente las propiedades de sinéresis y viscosidad. Como se ha comentado anteriormente, un objetivo en el diseño del producto ha sido incrementar la retención de suero de la leche fermentada experimental usando la ultrafiltración en lugar de otros métodos de concentración, como puede ser la adición de leche en polvo.

Para ello, se elaboraron leches fermentadas de cabra desnatadas, utilizando como materia prima sólo leche, leche con adición de leche en polvo y leche ultrafiltrada, y parando el proceso de fermentación a pH 4,6 y pH 4,2. Concretamente, se midieron sinéresis y viscosidad de las siguientes leches fermentadas desnatadas:

- Leche fermentada desnatada, pH 4,2
- Leche fermentada desnatada, pH 4,6
- Leche fermentada desnatada con adición de leche en polvo, pH 4,2
- Leche fermentada desnatada con adición de leche en polvo, pH 4,6
- Leche fermentada desnatada ultrafiltrada con *L. plantarum* C4, pH 4,2
- Leche fermentada desnatada comercial

### • Sinéresis

El método utilizado para determinar el grado de sinéresis se basó en el descrito por Staffolo y col. (2004) con algunas modificaciones. Se elaboraron leches fermentadas controles y experimentales siguiendo las pautas y condiciones descritas, con la única diferencia de que en lugar de frascos de yogur de 200 mL, la leche fermentada se elaboró en probetas graduadas de 100 mL y se almacenó en refrigeración. Se midió el volumen de desuerado a lo largo del tiempo (0-21 días de almacenamiento). El índice de sinéresis (%) se expresó como mL de suero por 100 mL de muestra inicial.

- **Viscosidad**

La viscosidad se determinó en yogures de 200 mL utilizando un viscosímetro. Para proceder a la medida, la muestra de leche fermentada se utilizó siempre una semana después de su elaboración, se llevó a 25°C y se aplicó una velocidad de 100 rpm con el torque durante 3 min para estandarizar las condiciones iniciales. Una vez hecho esto, se midió la viscosidad y el estrés en función de la aplicación de distintas velocidades crecientes (entre 0,5 y 100 rpm). Los resultados fueron la media de 3 medidas y se expresaron en valores de estrés en función de la velocidad que se aplicó a la muestra (0,5-20 rpm).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN





Durante la última década, el interés del consumidor por la comida saludable ha cambiado drásticamente. El aumento de los gastos médicos es uno de los factores que fuerzan a la búsqueda de medios baratos y efectivos para el mantenimiento de la salud, lo que ha llevado a un incremento en el interés por los alimentos funcionales. Los productos lácteos, especialmente los fermentados, ocupan casi el 42% del mercado de dicho sector, ya que no sólo presentan un gran valor nutricional, sino que también se ha demostrado que aportan importantes beneficios para la salud (Barbaros y col., 2010). Éstos se enriquecen con componentes funcionales y aunque los productos lácteos con  $\omega$ -3, fitosteroles, isoflavonas, ácido linoleico conjugado (CLA), péptidos bioactivos, minerales y vitaminas juegan un importante papel en el desarrollo de los alimentos funcionales, la incorporación de probióticos se ha incrementado rápidamente en las últimas dos décadas y se encuentra a la cabeza de la innovación en dicho sector, pues su consumo aporta múltiples beneficios (Champagne y col., 2009).

Es bien sabido que las bacterias probióticas (especialmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) crecen débilmente en leche debido a su baja actividad proteolítica e inhabilidad de utilizar lactosa (Saarela y col., 2009). Estas bacterias también necesitan ciertos compuestos para su crecimiento que no están presentes en la leche (Roy, 2001; Ostlie y col., 2003). Para mejorar la viabilidad de las bacterias probióticas en leches fermentadas, varias sustancias han sido añadidas a la leche, entre ellas fructooligosacáridos, concentrados de proteína de suero de leche, extractos de levadura, aminoácidos, precursores de nucleótidos, etc. (Ostlie y col., 2003; Janer y col., 2004; Stephenie y col., 2007).

Concretamente en nuestro estudio, *L. plantarum* C4 ha demostrado propiedades beneficiosas para la microbiota humana en presencia de fructooligosacáridos, resultados que se describen en el Capítulo IV del presente trabajo. En el caso de la leche de cabra, además de los beneficios para la salud citados, se ha visto que determinados probióticos crecen más rápido y tienen mayor actividad fermentadora que en leche de vaca, así como también los recuentos son mayores en todas las fases de la fermentación. La mayor cantidad de algunos minerales como Ca, Mg y Zn podría influenciar el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, ya que éstos forman parte de complejos enzimáticos envueltos en la fermentación de la lactosa. La mayor concentración de proteínas del suero podría también favorecer el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* gracias a los altos niveles de algunos aminoácidos. Estos resultados indican que el uso de distintos microorganismos es adecuado para obtener fermentados de leche cabra funcionales (Bozanic y col., 2004; Slacanac y

col., 2010). Por otro lado, la selección de la bacteria probiótica y optimización de las condiciones de elaboración (tanto formulación como almacenado) son de extrema importancia en la viabilidad de dichos microorganismos en la leche fermentada (Saarela y col., 2004, 2006; Martínez-Villaluenga y col., 2007). Es en este contexto en el que se optimizó el proceso de elaboración de una leche de cabra fermentada desnatada y ultrafiltrada, con efecto probiótico, estudiando además las interacciones microbiológicas y propiedades físico-químicas y texturales del producto final.

A pesar de los esfuerzos en el desarrollo de nuevos productos lácteos, una apropiada validación científica de las reivindicaciones funcionales supone una cuestión crítica en el campo de dichos alimentos, constituyendo un gran desafío para la industria láctea. Sin embargo, estas nuevas demandas representan una oportunidad de oro en la que investigación, desarrollo e innovación serían la clave para el futuro del sector de las leches fermentadas (Sánchez y col., 2009). La tabla 4 muestra algunos ejemplos de leches fermentadas con probióticos hoy disponibles en el mercado, y las cepas usadas en cada caso (Barbaros y col., 2010). En la actualidad, los probióticos más conocidos y de mayor utilización son: *L. plantarum* 299, *L. rhamnosus* GG y *Bifidobacterium* (Montrose y col., 2005).

La leche fermentada de cabra con probióticos representa un grupo de productos con grandes perspectivas de futuro en base a sus propiedades.

Cada cepa de probióticos posee efectos beneficiosos sobre la salud y varían según la cantidad ingerida y la duración de la administración. Bozanic y col. (2001) fermentaron leche caprina y bovina con *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12. Más tarde, Bozanic encontró un crecimiento más rápido de *L. acidophilus* La-5 en leche de cabra que de vaca (2004), y Slacanac y col. (2004, 2005) encontraron resultados similares para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en todas las fases de la fermentación.

Algunas bacterias aisladas de la leche materna, como *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus reuteri*, *L. plantarum*, *Lactobacillus fermentum* o *Enterococcus faecium* se consideran potenciales bacterias probióticas. De hecho, algunas de ellas ya se incluyen en productos probióticos comerciales (tabla 4). Así, los resultados de estos estudios científicos han sido un gran apoyo para este sector.

**Tabla 4.** Ejemplos de leches fermentadas con probióticos comerciales (Modificado de Bárbaros y col., 2010).

Producto	Probiótico
Acidophilus milk	<i>L. acidophilus</i>
Sweet acidophilus milk	<i>L. acidophilus</i>
Acidophilin	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. lactis</i> , levaduras del kéfir
Nu-Trish A/B	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp.
Diphilus milk	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Biomild	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Cultura® o A/Bmilk	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Bifihurt®	<i>B. longum</i> (CKL 1969) o <i>B. longum</i> (DSM 2054)
Acidophilus buttermilk	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , subsp. <i>cremoris</i> , subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
Acidophilus-yeast milk	<i>L. acidophilus</i> , <i>Saccharomyces lactis</i>
Bifidus milk	<i>B. bifidum</i> o <i>longum</i>
Yakult	<i>L. casei</i> Shirota
Yakult Miru-Miru	<i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i> o <i>B. breve</i> , <i>L. acidophilus</i>
A-38 fermented milk	<i>L. acidophilus</i> , cultivos lácticos mesófilos
Onaka He GG, Gefilus (Valio Ltd)	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG
CHAMYTO	<i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>
Vitagen	<i>L. acidophilus</i>
Procult drink	<i>B. longum</i> BB536, <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>
Actimel	<i>L. casei</i> Immunitas™
AKTfit, Biola, BioAktiv, YOMO, LGG+, Yoplait360°, Kaiku Actif	<i>L. rhamnosus</i> GG
Gaio	<i>L. casei</i> F19
Verum	<i>L. rhamnosus</i> LB21
ProViva	<i>L. plantarum</i> 299v
Yogur bifidus, bifidus natural, bifidus 0%	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Activia® Bifidus actiregularis	<i>B. lactis</i> DN-173010

En lo que respecta a nuestra cepa, *L. plantarum* C4, se han obtenido resultados que demuestran su actividad y efectos probióticos, sus propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, modula la microbiota intestinal, podría ejercer efectos antiinflamatorios y tener propiedades citotóxicas en células tumorales (Bujalance y col., 2007; Fuentes y col., 2008, 2008b; Puertollano y col., 2008, 2009, 2013). Debido a que los beneficios para la salud son específicos de cada cepa, éstas podrían ser seleccionadas en función del grupo de consumidores, pues la microbiota intestinal es diferente a lo largo de las distintas etapas de la vida, o incluso para grupos de individuos con necesidades especiales. Aún así, hoy día los probióticos en uso son bacterias con beneficios generales y para la población en general (Sánchez y col., 2009).

### 7.1. Optimización del proceso de elaboración de la leche fermentada

Tras la realización de las distintas leches fermentadas y el estudio de cada uno de los puntos críticos durante el diseño y desarrollo de las mismas, y en base a los resultados obtenidos, se estandarizaron las condiciones de elaboración (figura 11).

Tras recoger y desnatar la leche de partida como se describe en el apartado 6.3., se ultrafiltraron 3,6 L de la misma utilizando una membrana de 50 kDa, obteniéndose 2,12 L de leche concentrada y 1,48 L de suero. El método de concentración de la leche elegido fue la **ultrafiltración** porque se consiguieron mejores características de textura en el producto final, frente a la adición de leche en polvo, como se describe en el apartado 7.4.

La pasteurización se realizó a 80°C durante 30 min, comprobando su eficacia mediante las pruebas de la peroxidasa y la fosfatasa.

Aunque la temperatura óptima para el desarrollo de las bacterias lácticas propias del yogur es de 42°C, los microorganismos fueron inoculados e incubados a **37°C**, pues se observó que ésta era la temperatura óptima para la cepa a ensayar, *L. plantarum* C4, y no afectaba al crecimiento y actividad fermentadora de los microorganismos tradicionales del yogur (tabla 5).

**Tabla 5.** Crecimiento de los microorganismos fermentadores a 37°C y 42°C.

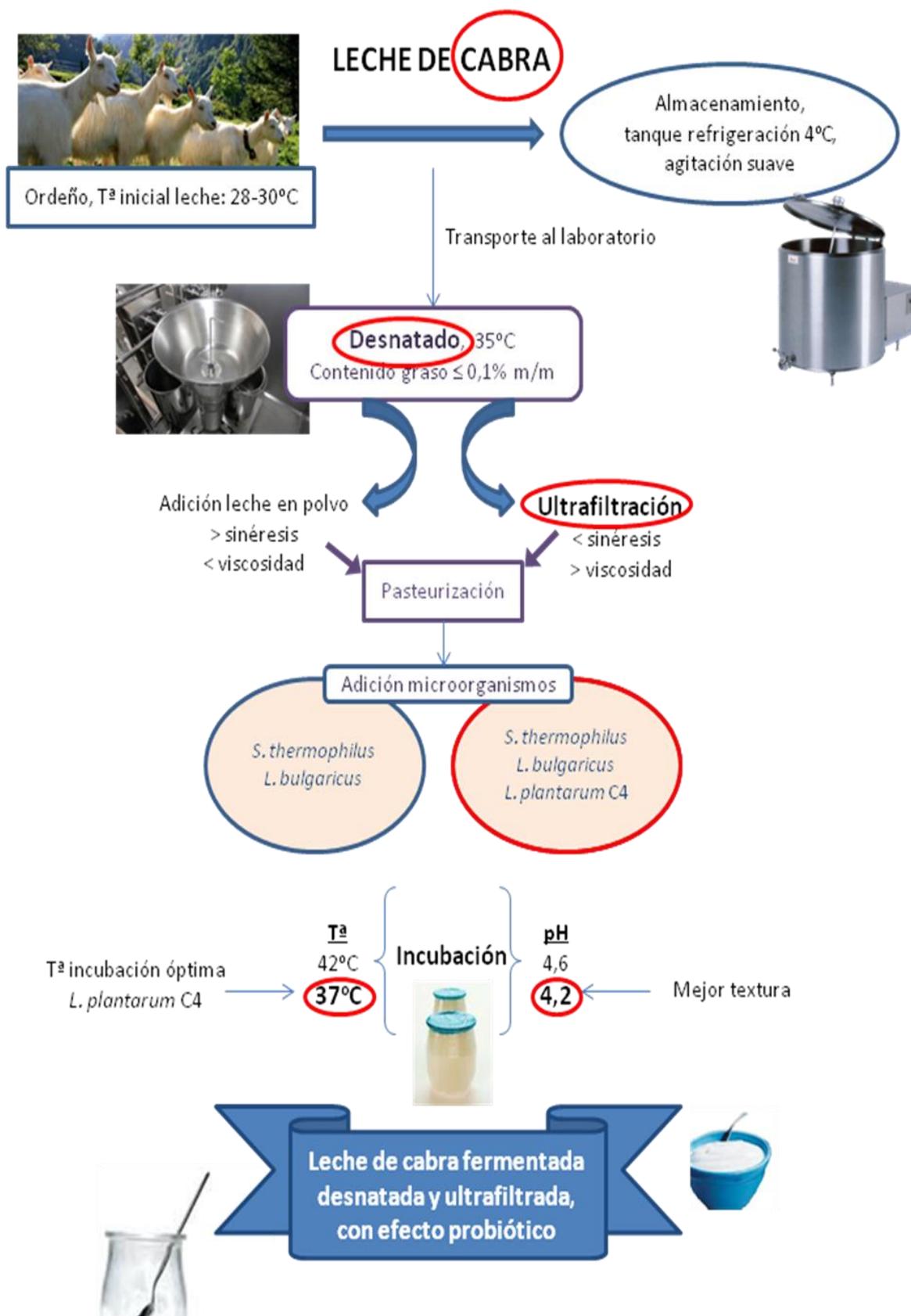
Microorganismo	T <sup>a</sup> (°C)	Bacterias viables, tiempo inicial (ufc/mL)	Bacterias viables, tiempo final (ufc/mL)
<i>L. plantarum</i> C4	42	2,1 x 10 <sup>4</sup>	3,5 x 10 <sup>4</sup>
Starter		1,6 x 10 <sup>6</sup>	9,5 x 10 <sup>8</sup>
<i>L. plantarum</i> C4	37	2,6 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>
Starter		7,0 x 10 <sup>6</sup>	4,8 x 10 <sup>8</sup>

Se elaboraron las siguientes leches fermentadas:

- *Leche fermentada control*, con los microorganismos tradicionales del yogur. Éstos se añadieron a una concentración de 0,032 g/L, como se detalla en el apartado 6.3.
- *Leche fermentada experimental*, añadiendo los microorganismos propios del yogur y *L. plantarum* C4. Éste se añadió a **10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> ufc/mL**, como se describe en el apartado 6.3. El microorganismo se inoculó a esta concentración tras estudiar el crecimiento e interacciones con los starters mediante recuentos en placas y ensayos de antibiosis, como se describe a continuación, en el apartado 7.2.

Se incubaron a 37°C durante 6 h o hasta que se alcanzó el pH deseado, éste fue concretamente **4,2** y no 4,6 como marcan las normas de elaboración de leches fermentadas de vaca, tras observar una notable mejora en las características de textura del producto final, como se detalla en el apartado 7.2.

Por último, se procedió al enfriamiento rápido de las leches fermentadas en cámara fría (4°C).



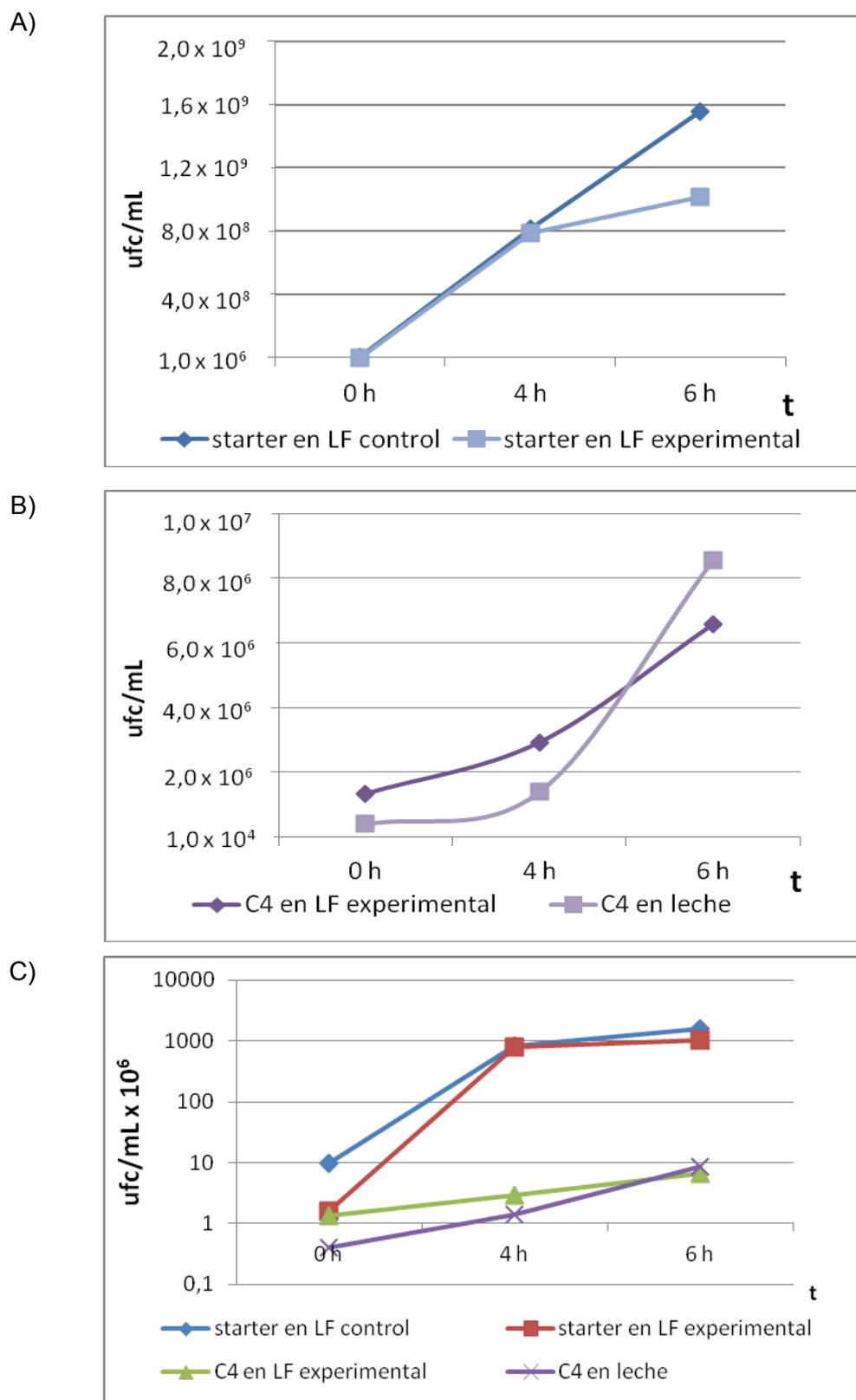
**Figura 11.** Optimización del proceso de elaboración de la leche de cabra fermentada desnatada, con efecto probiótico. LF: leche fermentada.

## 7.2. Estudio microbiológico

### • Evaluación del crecimiento de los cultivos

Cuando la leche de cabra se fermentó con *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *L. plantarum* C4, éste último no inhibió el crecimiento de las cepas del starter, en comparación con el starter sólo (figura 12.A), además la adición de dicha cepa no afectó la caída del pH durante el proceso de fermentación. Por otro lado, el descenso de pH debido a la acción fermentadora de los microorganismos propios del yogur abolió la proliferación de *L. plantarum* C4, aunque la viabilidad de la bacteria probiótica no fue afectada (figura 12.B).

Por tanto, se observó que en leche de cabra, *L. plantarum* C4 no inhibió el crecimiento de los starters. Sin embargo, éste no creció, aunque la viabilidad permaneció constante (tabla 6). Fue por ello que, para obtener una concentración de probiótico suficientemente alta en el producto final, fue necesario aumentar la concentración inicial del inóculo del probiótico a  $10^8$ - $10^9$  ufc/mL. Bajo estas condiciones, no hubo interacciones negativas entre las tres bacterias (tabla 7).



**Figura 12.** A) Comparación del crecimiento del starter solo en la leche fermentada control, y junto con *L. plantarum* C4 en la leche fermentada experimental. B) Comparación del crecimiento de *L. plantarum* C4 solo en la leche, y junto con el starter en la leche fermentada experimental. C) Representación del crecimiento de las cepas durante el proceso de fermentación.

**Tabla 6.** Resultados del co-cultivo (inóculo *L. plantarum* C4 a  $10^5$ - $10^6$  ufc/mL).

Medio (leche de cabra)	Bacterias		Tiempo de incubación (h)	pH	Bacterias viables/mL (log)	
	Starters	<i>L. plantarum</i> C4			Starters	<i>L. plantarum</i> C4
Leche desnatada pasteurizada	✓		0	6,46	6,70	
			4	4,92	8,74	
			8	4,00	8,48	
		✓	0	6,57		5,08
			4	6,55		5,59
			8	6,57		6,40
	✓	✓	0	6,57	6,74	5,04
			4	6,44	8,04	5,48
			8	4,86	8,14	6,20
Leche desnatada pasteurizada ultrafiltrada	✓		0	6,22	6,48	
			4	3,95	8,43	
			8	3,86	8,41	
		✓	0	6,33		5,57
			4	6,47		6,10
			8	6,54		6,95
	✓	✓	0	6,27	6,12	5,58
			4	4,37	8,00	5,90
			8	4,25	8,33	6,70

✓ adición del microorganismo

**Tabla 7.** Resultados del co-cultivo (inóculo *L. plantarum* C4 a  $10^8$ - $10^9$  ufc/mL).

Medio (leche de cabra)	Bacterias		Tiempo de incubación (h)	pH	Bacterias viables/mL (log)	
	Starters	<i>L. plantarum</i> C4			Starters	<i>L. plantarum</i> C4
Leche desnatada pasteurizada ultrafiltrada	✓		0	6,51	6,87	
			6	4,44	9	
	✓	✓	0	6,28	6,54	9,15
			6	4,37	8,54	9,32

✓ adición del microorganismo

### • Ensayos de antibiosis

Cuando se estudió la antibiosis mediante el “spot test” en placas de agar, *L. plantarum* C4 fue capaz de ejercer un efecto inhibitorio en el crecimiento de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, especialmente en los casos en que la capa inferior era agar MRS, medio con alto contenido en dextrosa. En cuanto a la acción de los starters, éstos se inhibieron levemente entre sí, y en ningún caso inhibieron el crecimiento de *L. plantarum* C4 (tabla 8). Esta inhibición no ocurrió en TSA, medio con bajo contenido en dextrosa. En base a estas observaciones, la inhibición podría ser atribuible a la producción de ácido a partir de la fermentación de dicho azúcar. La única excepción fue la acción de *L. plantarum* C4 sobre *L. bulgaricus* en TSA, quizás debida a productos como bacteriocinas de la cepa C4.

**Tabla 8.** Inhibiciones entre cepas en ensayos de antibiosis mediante el “spot test”. Diámetros de inhibición (mm).

Cepa testada	Cepa diana					
	<i>L. plantarum</i> C4		<i>L. bulgaricus</i>		<i>S. thermophilus</i>	
	MRS	TSA	MRS	TSA	MRS	TSA
<i>L. plantarum</i> C4	12	0	27	18	23	0
<i>L. bulgaricus</i>	0	0	15	0	12	0
<i>S. thermophilus</i>	0	0	15	0	14,5	0

Los resultados del “spot test” no mostraron una buena correlación con la actuación de las tres cepas durante la fermentación, ilustrando así la importancia de los factores ambientales como es la naturaleza de los azúcares. Las tres cepas utilizadas para la elaboración de nuestro producto lácteo (los starters *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y la cepa probiótica *L. plantarum* C4) no mostraron interacciones negativas durante el proceso de fermentación.

Por tanto, teniendo en cuenta el comportamiento del probiótico y de las cepas del starter, se fijaron las condiciones óptimas para el proceso de fermentación y elaboración de la leche fermentada. Particularmente, se fijó la temperatura de fermentación a 37°C, pues es la temperatura óptima para *L. plantarum* C4 y el comportamiento de las cepas del starter no se afecta, ya que crece igual que a 42°C. Con el objetivo de conseguir una concentración final de  $10^8$ - $10^9$  ufc/mL de cada cepa en el producto, se inoculó el starter a  $10^6$  ufc/mL, al ver que crecía dos potencias, y la cepa de *L. plantarum* C4 fue inoculada directamente a  $10^8$ - $10^9$  ufc/mL, tras observar que mantenía su viabilidad pero no crecía durante el proceso de fermentación.

En cuanto a las interacciones y crecimiento de las diferentes cepas en nuestro producto, se observó inhibición en los ensayos de antibiosis en placas pero no en el proceso de fermentación en la leche. Esto se puede deber al tipo y cantidad de azúcar de cada medio, pues en MRS los microorganismos utilizan dextrosa mientras que en la leche éstos fermentan lactosa.

Diferentes tasas de crecimiento y fermentación de probióticos en función de los carbohidratos han sido descritas anteriormente para *Lactobacillus brevis* (Zhan y col., 2006), *B. longum* (Mlobeli y col., 1998), *Bifidobacterium infantis* (Perrin y col., 2001), *L. bulgaricus* (Chervaux y col., 2000), *L. helveticus* y *L. rhamnosus* (Champagne y col., 2009).

Últimamente, se ha destacado la importancia del estudio y selección de las cepas para una eficiente fermentación. Por ejemplo, se ha visto que *S. thermophilus* no acidifica muy rápido la leche en ausencia de *L. bulgaricus*, ambos usados tradicionalmente en la elaboración de yogures. Champagne y col. (2009) observaron que *S. thermophilus* creció mejor sólo que en cultivos mixtos con otros probióticos, en nuestro caso dicho efecto no fue perceptible, pues el starter compuesto por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* creció igualmente sólo que en compañía de *L. plantarum* C4.

El crecimiento de nuestra cepa probiótica en leche fue menor que el de los starters y cuando se co-cultivaron no mostró grandes cambios, como se observó para *L. helveticus* R0052 en el estudio mencionado. En otros casos se ha observado que el starter sí que afecta a la evolución de otros probióticos en la elaboración de leches fermentadas (Dave y col., 1997). Esto muestra la variabilidad en las relaciones e interacciones entre los cultivos iniciadores y los probióticos y denota la necesidad de seguir estudiando si dichas interacciones están ligadas a competición por sustratos, producción de compuestos inhibidores, proteólisis o evolución del pH durante la fermentación (Wang y col., 2002).

En relación al número de microorganismos en el producto final, muchas industrias de leches fermentadas probióticas garantizan 1 billón de microorganismos por porción, que generalmente equivale a  $10^7$  ufc/mL, cantidad indicada también en el Real Decreto 179/2003, por el que se aprueba la norma de calidad para el yogur. Los datos de nuestro estudio muestran que se pueden alcanzar niveles mucho más altos si la cepa probiótica se inocula a altas concentraciones y al mismo tiempo que el starter, al principio del proceso de fermentación, lo que también ha sido descrito por otros autores (Champagne y col., 2009; Minervini y col., 2009).

Además, diversos estudios sostienen que para que los probióticos ejerzan su actividad y proporcionen los beneficios que se les atribuyen, es necesario que lleguen viables al intestino y en cantidades muy altas, de  $10^8$  a  $10^{11}$  ufc/día (Galdeano y col., 2004; Parvez y col., 2006; Shah, 2007). En el pasado, muchos probióticos se seleccionaban por su capacidad de crecer y sobrevivir en la leche fermentada. Hoy en día, las características tecnológicas de dichas cepas se están convirtiendo en un factor menos importante que sus demostrados efectos beneficiosos para la salud. En esta situación, primero se eligen las cepas probióticas específicas y después es la industria la que debe diseñar y desarrollar el proceso de elaboración y las cepas iniciadoras adecuadas de forma que el producto resultante sea exitoso y permita el uso de dichos microorganismos.

### • Consumo preferente

En cuanto a los ensayos de consumo preferente de la leche fermentada, se observó que los microorganismos permanecieron viables y se encontraban a la misma concentración, en refrigeración a 4°C, tras 4 semanas desde su elaboración, a partir de ésta empezó a disminuir el número de microorganismos,

aunque siguieron estando por encima de  $10^7$  ufc/mL incluso en la semana 6 (tabla 9).

**Tabla 9.** Recuentos bacterianos (log ufc/mL) tras la fermentación y transcurridas 3, 4, 5 y 6 semanas de almacenamiento a 4°C de las leches fermentadas (LF) control y experimental.

	Cultivo	Tiempo (semanas)				
		0	3	4	5	6
<b>LF control</b>	<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	$1,02 \times 10^9$	$1,03 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$	$4,65 \times 10^8$	$3,80 \times 10^7$
<b>LF experimental</b>	<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	$3,75 \times 10^8$	$2,95 \times 10^8$	$5,80 \times 10^8$	$1,60 \times 10^9$	$1,94 \times 10^8$
	<i>L. plantarum</i> C4	$1,65 \times 10^9$	$1,28 \times 10^9$	$2,15 \times 10^9$	$1,20 \times 10^9$	$1,9 \times 10^8$

Kongo y col. (2006) indicaron que la supervivencia de los microorganismos durante la refrigeración proporcionará a la leche fermentada los efectos beneficiosos basados en las altas concentraciones de probióticos. Por tanto, podemos concluir que la leche de cabra fermentada desarrollada en el presente estudio posee una larga vida media y que proporcionará los efectos beneficiosos basados en el starter y en la cepa *L. plantarum* C4.

Esto también fue observado anteriormente en otras leches fermentadas experimentales tanto con leche de cabra (Martín-Diana y col., 2003) como de vaca (Minervini y col., 2009) para microorganismos starters (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) y para otras bacterias probióticas como *L. plantarum* 1288. Este último no mostró disminución durante el almacén y, en general, los números de estreptococos fueron más altos que los de lactobacilos (Tamime y col., 1997).

### 7.3. Análisis físico-químico

Los resultados del análisis físico-químico de la leche de partida y de las leches fermentadas se detallan en las tablas 10 y 11, respectivamente.

**Tabla 10.** Resultados de los análisis físico-químicos de la leche (n=10).

	Leche cruda	Leche desnatada ultrafiltrada pasteurizada
<b>pH</b>	7	7
<b>Acidez (g láctico/100 mL)</b>	0,148±0,01	0,186±0,00
<b>Densidad/Quevenne (g/mL)</b>	1,031±0,00	1,040±0,00
<b>Peroxidasa/Fosfatasa</b>	-	Negativo
<b>Humedad (%)</b>	86,71±0,20	88,7±0,15
<b>Grasa (%)</b>	5,33±0,30	0,1±0,00
<b>Lactosa (g lactosa/100 mL)</b>	4,80±0,02	4,90±0,04
<b>Proteínas (g/100 g)</b>	3,74±0,00	5,98±0,02

**Tabla 11.** Resultados de los análisis físico-químicos de las leches fermentadas (n=10).

	Leche fermentada control	Leche fermentada experimental
<b>pH</b>	4,3±0,01	4,2±0,01
<b>Acidez (g láctico/100 mL)</b>	1,04±0,00	1,27±0,01
<b>Humedad (%)</b>	87,6±0,05	87,0±0,04
<b>Grasa (%)</b>	0,1±0,00	0,1±0,00
<b>Lactosa (g lactosa/100 mL)</b>	3,23±0,26	3,26±0,37
<b>Proteínas (g/100 g)</b>	5,85±0,20	5,83±0,20

La tabla 12 muestra los datos más recientes de composición físico-química de leches y leches fermentadas de cabra, tanto experimentales como comerciales, encontrados por otros autores.

**Tabla 12.** Composición físico-química de leches y leches fermentadas de cabra.

	Leche	Leche fermentada
<b>Acidez (g láctico/100 mL)</b>	0,150 - 0,190	0,87 - 1,08
<b>Humedad (%)</b>	85,20 - 89,20	86,65 - 90,12
<b>Grasa (%)</b>	2,00 - 6,63	0 - 5,25
<b>Lactosa (g lactosa/100 mL)</b>	3,40 - 5,12	1,88 - 5,58
<b>Proteínas (g/100 g)</b>	2,60 - 4,60	3,32 - 3,47

Fuente: Rivas y col., 2005; Güler-Akin y col., 2007; Raynal-Ljutovac y col., 2008; Sanz y col., 2009; Costa y col., 2010; Slacanac y col., 2010; Quintana, 2011.

El pH de la leche de partida fue 7, mientras que en las leches fermentadas control y experimental siempre se obtuvieron valores de 4,2, éste fue el pH elegido como punto final del proceso de fermentación, tras observar que se conseguían mejores características texturales que a pH 4,6, como se detalla en el apartado 7.4.

La acidez fue mayor en las leches fermentadas que en la leche, debido a la fermentación por los microorganismos, y fue mayor en la experimental que en la control. Para la leche de vaca, se establece como límite máximo permitido de acidez un valor 0,20 g láctico/100 mL. Tanto los valores obtenidos en leche como los de leche fermentada coinciden con los encontrados por otros autores (tabla 12).

El valor de humedad de la leche cruda se situó en el rango encontrado por otros autores, La leche de partida desnatada y ultrafiltrada también presentó una humedad dentro de los rangos descritos anteriormente (88,7%). Con respecto a las leches fermentadas, existen ciertas características de calidad como un cuerpo débil, textura pobre, separación del suero y variaciones en la consistencia, debido al bajo contenido en sólidos totales. Para solucionar estos problemas, nuestras leches fermentadas fueron formuladas usando la ultrafiltración como método de concentración de la leche de partida, tras observar sus beneficios, descritos en el apartado 7.4, y presentaron por tanto una humedad de 87,0-87,6%.

La materia grasa es uno de los componentes más importantes de la leche, pero a la vez el más variable, dependiendo de factores ambientales y del estatus del animal (Raynal-Ljutovac y col., 2008). La leche de cabra suele tener una mayor cantidad de

grasa que la de vaca. Según las tablas de composición química de alimentos publicadas por Jiménez y col. (2002), CESNID (2004), Mataix-Verdú (2009), y Moreira y col. (2011), la leche de cabra posee entre el 3,9 y 4,5% de materia grasa, aunque depende mucho de la raza caprina de la que se trate, llegando algunas hasta un 5,5% (Quintana, 2011). Los valores observados para leche cruda en el presente estudio coincidieron con los encontrados por otros autores. Tras el desnatado, el contenido de grasa en la leche y leches fermentadas elaboradas fue de 0,1% y 0%, respectivamente, consiguiendo así una mejor digestibilidad del producto final y disminuyendo los posibles inconvenientes asociados al consumo de alimentos grasos.

Los valores de lactosa encontrados en la leche fueron de 4,80% y 4,90%, mientras que en las leches fermentadas control y experimental fueron algo más bajos (3,23% y 3,26%, respectivamente), coincidiendo con los niveles descritos anteriormente por otros autores para leche fermentada de cabra. Según Richardson (2004), si se compara con la de otras especies animales, el contenido de lactosa es bajo en leche de cabra (de 1 a 13% menos que la de vaca y hasta 41% menos que la humana), lo cual está directamente relacionado con que este tipo de leche presente menos problemas asociados a la intolerancia de la misma.

El contenido total de proteínas es uno de los principales criterios de calidad que se aplican a la leche de cabra en el momento de establecer el pago de la misma. En las tablas de composición de alimentos, los datos de leche de cabra superan ligeramente a los de leche de vaca. Según el código alimentario español, el contenido mínimo debe ser de 3,80%, aunque los valores son variables (Raynal-Ljutovac y col., 2005; Pirisi y col., 2007, Quintana, 2011). En el presente estudio, el valor observado en la leche cruda (3,74 g/100 g) coincidió con los de otros autores (tabla 12). Sin embargo, tras la ultrafiltración se consiguió aumentar el contenido proteico de la leche de partida hasta 5,98 g/ 100 g. Así, las leches fermentadas presentaron valores de 5,83-5,85 g/100 g, superiores a los encontrados en otras investigaciones. Gracias a ello, se consiguieron mejores características texturales y se obtuvo un producto de gran valor nutricional.

#### 7.4. Estudio de la textura

La susceptibilidad de presentar sinéresis y la viscosidad son importantes propiedades a estudiar a la hora de elaborar una leche fermentada. Los productos lácteos obtenidos por coagulación y en especial el yogur, presentan un gel de textura pobre con tendencia a la sinéresis o desuerado. Con la cantidad natural de sólidos de la leche, el gel formado es extremadamente débil y frágil e impropio para uso comercial. Para remediar esta situación, normalmente la industria procede a la adición de 2-5% de sólidos lácteos como leche en polvo antes de la fermentación. Sin embargo, durante el almacenamiento, en especial a alta temperatura, el gel presenta sinéresis. Para impedir este fenómeno y evitar defectos, la leche en polvo se puede reemplazar total o parcialmente por hidrocoloides u otros estabilizantes con conocido efecto sobre la textura y control de la sinéresis (Castillo y col., 2012).

Ahora bien, atendiendo al comportamiento proteico, el punto isoeléctrico de la caseína bovina se sitúa en torno a pH 4,6, mientras que las proteínas caprinas lo alcanzan a pH 4,2. Cuando se alcanza este pH, es cuando se produce la coagulación de la mayor parte de las caseínas, llevando a la formación del gel y a una mejora en la retención del suero, que se traduce en una menor sinéresis y mejores características reológicas en el producto final. Dado que la materia prima de nuestro producto es la leche de cabra, para la elaboración de la leche fermentada nos planteamos alargar el proceso de fermentación hasta alcanzar un pH 4,2, en lugar de 4,6 como se dicta en la elaboración de leches fermentadas de vaca. Es por ello que se compararon leches fermentadas elaboradas a ambos valores de pH y se estudió así si se consiguió una mejora en la viscosidad y sinéresis del producto final, sin necesidad de añadir sustancias estabilizantes.

- **Sinéresis**

Teniendo en cuenta que durante la fermentación y elaboración de leches fermentadas lo que se obtiene es un gel, la sinéresis sería la expulsión de agua hacia el exterior con la consiguiente reducción de volumen. La cantidad de agua retenida en dicho gel depende de la capacidad de ligar agua de las proteínas, pues la microestructura del yogur o leche fermentada consiste en una red de partículas de caseína unidas en racimos y/o cadenas, formando una red con poros y áreas vacías en medio. La fase de agua se retiene en dichas áreas vacías y en los poros, y en el caso de romperse éstos, se produce la sinéresis. La fuerza de las cadenas entre las partículas, así como el estado de agregación e

interacción entre las proteínas de leche y los ingredientes funcionales, tienen relación con la viscosidad, cremosidad y sinéresis del producto (Villalta y col., 2001; Rojas-Castro y col., 2007).

En el presente estudio, la menor sinéresis se encontró en la leche fermentada ultrafiltrada (0%). Esto puede ser debido a que las caseínas, responsables de la formación de coágulos, están más concentradas. En cuanto a las otras leches fermentadas, la sinéresis mejoró con la adición de leche en polvo (5%) y con la disminución del pH a 4,2 (2%), debiéndose probablemente a la mayor cantidad de caseína coagulada, pues el punto isoeléctrico de las proteínas caprinas se alcanza a dicho pH, lo que llevaría a una mejora en la retención de suero (tabla 13).

**Tabla 13.** Porcentaje de sinéresis en las distintas leches fermentadas. LFD: leche fermentada desnatada.

Tiempo (días)	Sinéresis (% desuerado)					
	LFD		LFD + leche en polvo		LFD ultrafiltrada	
	pH 4,2	pH 4,6	pH 4,2	pH 4,6	pH 4,2	pH 4,6
0	0	0	0	0	0	0
6	2	8	0	2	0	0
8	2	10	0	2	0	0
12	2	12	0	2	0	0
14	2	12	2	5	0	0
19	2	14	2	5	0	0
21	2	14	2	5	0	0

### • Viscosidad

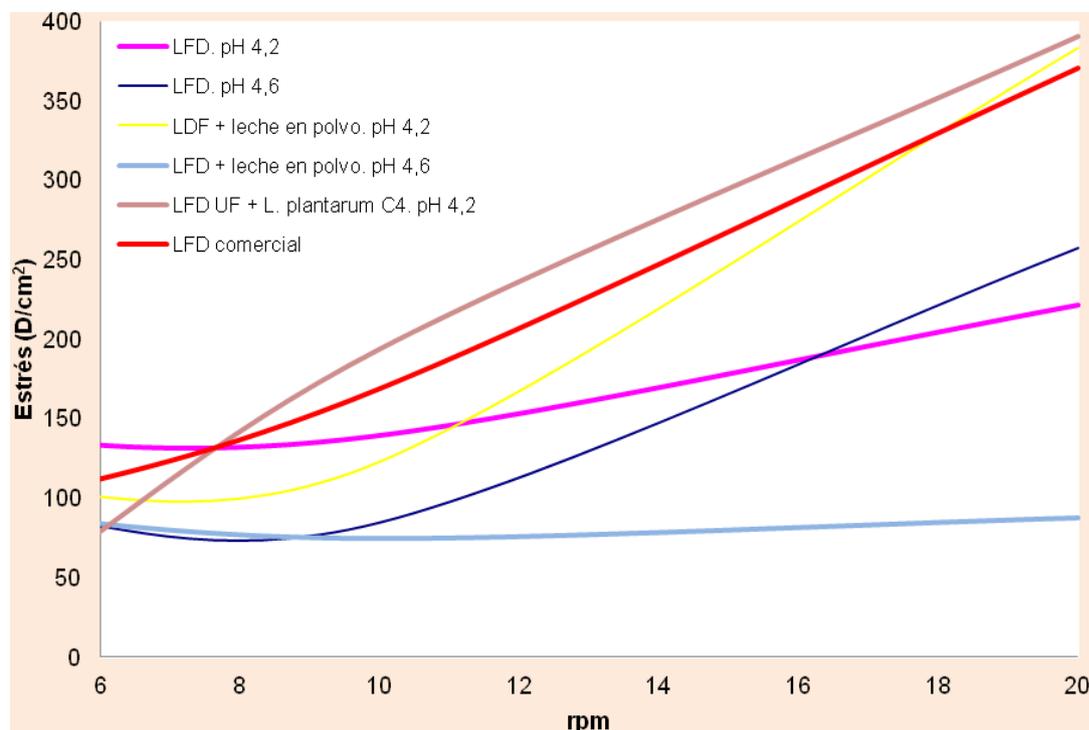
La viscosidad se puede definir como una medida de la resistencia a la deformación del fluido y su desarrollo se explica por la gelificación y las interacciones de las proteínas. La gelificación de las proteínas del suero se produce en dos etapas. Una primera etapa que abre o disocia las moléculas de las proteínas, seguida de una etapa de agregación. Para que esto ocurra ordenadamente es esencial que la agregación proceda de una corta etapa de disociación; por ejemplo, un calentamiento a pH 6 y 80°C (como el que utilizamos para pasteurizar la leche de partida) forma puentes iónicos y disulfuro que determinan la estructura del gel. Dependiendo de cuan cargadas están las

proteínas nativas se pueden formar dos tipos de gel; cuando la carga de repulsión es grande se forman agregados lineales y cuando es pequeña globulares. Así vemos que las proteínas del suero tienen un importante papel en la textura de determinados alimentos y se usan para modificar sus propiedades reológicas, pues gelificación y viscosidad son consecuencias que dependen de la capacidad de retención de las proteínas y de su estado, y son los mayores determinantes de la textura en muchos alimentos como el queso, yogur y otros productos lácteos fermentados (Villalta y col., 2001). La ultrafiltración permitió concentrar los constituyentes de la leche, entre ellos las proteínas, y aumentar la retención de suero. Además, se aumentó el extracto seco del producto sin alterar las proteínas, como ocurre cuando son sometidas a procesos de desecación para la obtención de leche en polvo.

Atendiendo al comportamiento de nuestras leches fermentadas como fluidos tixotrópicos y comparándolo con la curva de una leche fermentada comercial, se concluyó que las leches fermentadas experimentales con mejor comportamiento reológico y, por tanto, mejor textura, fueron las elaboradas alargando el proceso de fermentación hasta pH 4,2 y especialmente las que contenían leche en polvo (LFD + leche en polvo. pH 4,2) y la leche fermentada experimental (LFD UF + *L. plantarum* C4. pH 4,2) (figura 13). Esto puede deberse a que el punto isoeléctrico de las proteínas caprinas se alcanza a pH 4,2, además éstas se encuentran más concentradas en la leche ultrafiltrada, consiguiéndose a este pH la formación de un gel cremoso y con ello una mejora en la viscosidad y textura del producto.

En base a estos resultados, se eligió la ultrafiltración, pues además de obtener una mayor concentración de proteínas y mayor calidad en el producto final, éste mostró mejores propiedades reológicas y menos susceptibilidad a sinéresis, comparado con las leches fermentadas fortificadas con leche en polvo, traducándose todo ello en una mejor textura. La adición de *L. plantarum* C4 no influyó negativamente en las propiedades texturales.

**Figura 13.** Comportamiento reológico de las distintas leches fermentadas. LFD: leche fermentada desnatada. UF: ultrafiltrada.



Los productos de leche caprina están considerados como los lácteos con mayor potencial de marketing y, por tanto, las características de dicha leche son actualmente el foco de interés en investigación (Casalta y col., 2005). Desafortunadamente, existen muchas dificultades tecnológicas asociadas con la producción de leches fermentadas de cabra con buenas características sensoriales y la consistencia de estos productos se considera como uno de los puntos críticos (Farnsworth y col., 2006). Se están llevando a cabo diversos experimentos para mejorar la calidad sensorial.

En muchos de ellos, el contenido en sólidos no grasos de la leche se aumenta mediante distintos procedimientos como concentración de la leche con membranas, adición de estabilizadores como pectinas e inulina, y empleo de bacterias ácido-lácticas productoras de exopolisacáridos, con el fin de mejorar la textura de la leche fermentada de cabra, tanto entera como desnatada (Hess y col., 1997; Duboc y col., 2001; Martín-Diana y col., 2003; Stack y col., 2010). Diversos estudios demuestran que los exopolisacáridos producidos por las bacterias ácido-lácticas pueden contribuir a mejorar las características reológicas y la textura de la leche fermentada, disminuyendo la sinéresis y mejorando la viscosidad (Ismail y col., 2010; Stack y col., 2010).

Se han hecho estudios adicionando leche desnatada en polvo y concentrado de proteínas de suero de leche para incrementar los sólidos totales antes de la fermentación, concluyendo que la adición de concentrado de proteínas a la leche de cabra mejoró la textura del yogur final, dando un producto similar a los yogures de vaca comerciales, y algunos parámetros como firmeza, dureza y adhesividad se aumentaron y se mantuvieron durante toda la vida útil del producto (Remeuf y col., 2003; Herrero y col., 2006; Tratnik y col., 2006).

En otros casos, se consiguieron mejores propiedades texturales en el producto final enriqueciendo la leche de partida con vitaminas y minerales (Cueva y col., 2008), fibra (Staffolo y col., 2004), etc. De igual manera, Peng y col., (2009) sugirieron que la fortificación con diferentes tipos de proteína de leche tiene un efecto significativo en las propiedades reológicas del yogur.

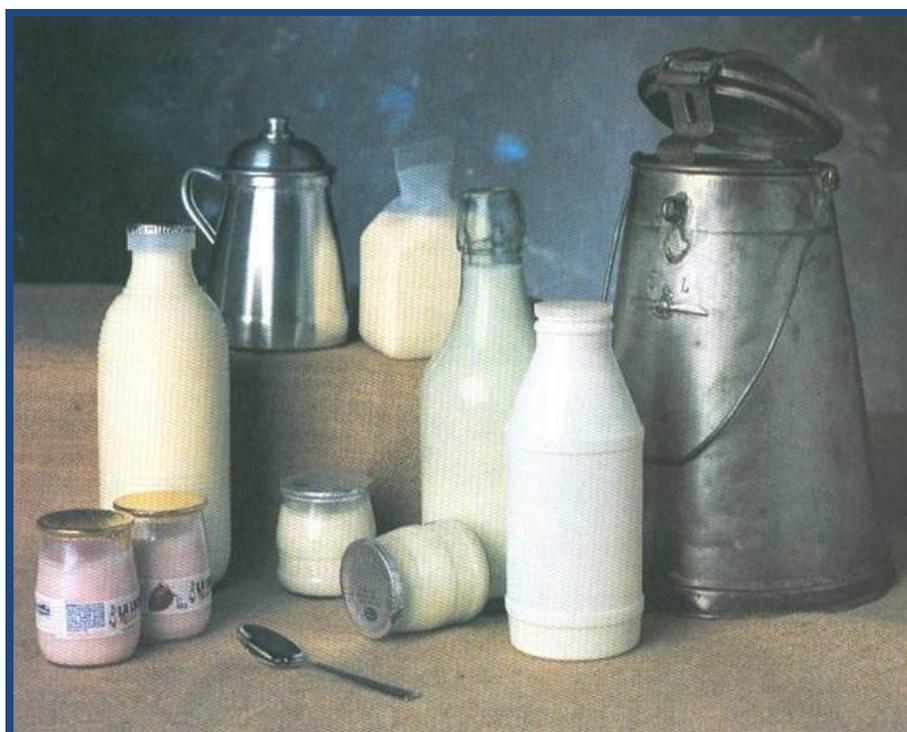
Los últimos avances muestran que la concentración de la leche de partida con métodos como la ultrafiltración aporta notables ventajas a las propiedades organolépticas de las leches fermentadas, frente a la adición de leche en polvo. Dichos resultados han sido observados también en el presente trabajo, pues el fermentado lácteo elaborado con leche ultrafiltrada mostró menor sinéresis y mejor viscosidad, en comparación con el mismo producto elaborado con adición de leche en polvo. Además, diversos autores han observado que la adición de leche en polvo causa un deterioro del olor y del sabor. Otros autores han concluido que las concentraciones de grasa y de proteína en leche de cabra se incrementan proporcionalmente con el ratio de concentración durante el proceso de ultrafiltración (Mehaia y col., 1998).

La firmeza del gel depende tanto de los sólidos totales como del contenido y tipo de proteínas (Oliveira y col., 2001). Esto demuestra la alta influencia causada por las diferencias en la caseína y en la estructura de las micelas (Vegarud y col., 1999) y la necesidad de seguir profundizando en el estudio de la relación entre la composición y la estructura con las características texturales del producto final.

Todos estos experimentos consiguen mejores características reológicas y sensoriales en productos fermentados de leche de cabra, sin embargo, éstos no han sido incorporados aún en el sector industrial (Slacanac y col., 2010).



## 8. CONCLUSIONES





1. El proceso de elaboración de una leche de cabra fermentada desnatada con adición simultánea de los cultivos propios del yogur y de *Lactobacillus plantarum* C4 como probiótico, requiere una T<sup>a</sup> de incubación de 37°C y alcanzar un pH final de 4,2.
2. No se observan interacciones negativas entre los microorganismos propios del yogur y *Lactobacillus plantarum* C4 durante el proceso de fermentación, y éste se mantuvo a concentraciones óptimas para ejercer su efecto probiótico (10<sup>9</sup> ufc/mL) tras cuatro semanas desde la elaboración del producto.
3. La ultrafiltración de la leche de partida como método de concentración del extracto seco magro, supone un incremento del contenido proteico de hasta 2,5 g/100 g, respecto a las leches de cabra fermentadas comerciales. Además, minimiza la sinéresis del coágulo y aporta mejores características de viscosidad y consistencia del producto.

### Conclusions

1. The manufacture of a fermented goat's skimmed milk with the yoghurt starter strains and *Lactobacillus plantarum* C4 as a probiotic, requires an incubation temperature of 37°C and a final pH of 4.2.
2. The microorganisms of the yoghurt and *Lactobacillus plantarum* C4 showed no negative interactions during the fermentation process, and this strain exhibited optimal concentrations to exert its probiotic effects (10<sup>9</sup> cfu/mL) four weeks after the elaboration of the product.
3. Milk ultrafiltration as a concentration method of the dry extract, leads to an increase of 2.5 g/100 g of protein, compared to commercial fermented goat's milks. In addition, it decreases the coagulum synaeresis and provides better viscosity and consistency properties.



## 9. BIBLIOGRAFÍA





**A**

Alfárez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Díaz-Castro J, Barrionuevo M, Ros PB, Campos MS. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *Int Dairy J* 2006, 16:813-21.

Aranceta J, Serra LL. *La leche y los lácteos en la alimentación de los españoles*. En: Aranceta J, Serra LI (Ed.) *Leche, Lácteos y Salud*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2007.

**B**

Barbaros HO, Huseyin AK. Functional milks and dairy beverages. *Int J Dairy Technol* 2010, 63:1-15.

Baró L, López-Huertas E, Boza JJ. *Leche y derivados lácteos*. En: Gil A (Ed.) *Tratado de Nutrición*. Tomo II: *Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2010.

Beermann C, Hartung J. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food Funct* 2013, 4(2):185-99.

Bergillos-Meca T, Navarro-Alarcón M, Cabrera-Vique C, Artacho R, Olalla M, Giménez R, Moreno-Montoro M, Ruiz-Bravo A, Lasserrot A, Ruiz-López MD. The probiotic bacterial strain *Lactobacillus fermentum* D3 increases in vitro the bioavailability of Ca, P, and Zn in fermented goat milk. *Biol Trace Elem Res* 2013, 151(2):307-14.

Bozanic R, Tratnik LJ, Parat M. Acceptability of yoghurt and probiotic yoghurt from goat milk. *Mljekarstvo* 2001, 51:317-26.

Bozanic R, Tratnik LJ, Herceg Z, Hruskar M. *The quality and acceptability of plain and supplemented goat's and cow's milk fermented with kefir culture*. En: *Fermented Milks*, Special Issue 0301. International Dairy Federation. Kolding, 2003.

Bozanic R, Tratnik LJ, Herceg Z, Maric O. The influence of milk powder, whey protein concentrate and inulin on the quality of goat and cow acidophilus milk. *Acta Aliment* 2004, 33:337-46.

Brule G, Lenoir J. *La coagulación de la leche*. Ediciones Omega. Barcelona, 1990.

Bujalance C, Jiménez-Valera M, Moreno E, Ruiz-Bravo A. A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. *J Microbiol Methods* 2006, 66:572-5.

Bujalance C, Moreno E, Jiménez-Valera M, Ruiz-Bravo A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int J Food Microbiol* 2007, 113:28-34.

## C

Cabrera-Vique C, Vicaria JM, Fonollá J, Roca AM. *Leche y preparados lácteos*. Editorial Universidad de Granada. Granada, 2013.

Caroli A, Poli A, Ricotta D, Banfi G, Cocchi D. Invited review: dairy intake and bone health: a viewpoint from the state of the art. *J Dairy Sci* 2011, 94(11):5249-62.

Casalta E, Cachena JM, Aubert C, Dufrene F, Noel Y, Beuvier E. Application of specific starters for manufacture of Venaco cheese. *Lait* 2005, 85:205-22.

Castillo M, Borregales C, Sánchez MD. Influencia de la pectina sobre las propiedades reológicas del yogur. *Mundo Lácteo y Cárnico* 2012, 1:4-9.

CESNID (Centre d'Ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica). *Tablas de composición de alimentos / Taules de composició d'aliments*. McGraw-Hill, Interamericana y Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona, 2004.

Champagne CP, Green-Johnson J, Raymond Y, Barrette J, Buckley N. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Res Int* 2009, 42:612-21.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 1998, 84:759-68.

Chervaux C, Ehrlich SD, Maguin E. Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66:5306-11.

*Código Alimentario Español y Disposiciones Complementarias*. Tecnos. Madrid, 2006.

Cueva O, Aryana KJ. Quality attributes of a heart healthy yogurt. *LWT-Food Sci Technol* 2008, 41:537-44.

## D

Daddaoua A, Puerta V, Requena P, Martínez-Férez A, Guadix E, de Medina FS, Zarzuelo A, Suárez MD, Boza JJ, Martínez-Augustin O. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 2006, 136(3):672-6.

Dave RI, Shah NP. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int Dairy J* 1997, 7:31-41.

De La Fuente LF, Barbosa E, Carriedo JA, Gonzalo C, Arenas R, Fresno JM, San Primitivo F. Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *J Dairy Sci* 2009, 92(8):3791-9.

Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Campos MS. Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferropenic anaemia. *Int Dairy J* 2009, 19:116-21.

Domagala J, Wszolek M. Effect of concentration method and starter culture type on the texture and susceptibility to syneresis of yoghurt and bio-yoghurts made of goat's milk. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc* 2008, 15(6):118-28.

Domagala J. Instrumental texture, syneresis and microstructure of yoghurts prepared from goat, cow and sheep milk. *Int J Food Prop* 2009, 12:605-15.

Domagala J, Wszolek M, Dudzinska A. The influence of the fortification method and starter culture type on the texture and microstructure of probiotic yoghurts prepared from goat's milk. *Milchwissenschaft* 2012, 67(2):172-6.

Dong JY, Szeto IM, Makinen K, Gao Q, Wang J, Qin LQ, Zhao Y. Effect of probiotic fermented milk on blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr* 2013, 110(7):1188-94.

Duboc P, Mollet B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int Dairy J* 2001, 11:19-25.

## **E**

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the suitability of goat milk protein as a source of protein in infant formulae and in follow-on formulae. *EFSA Journal* 2012, 10(3):2603-21.

Elwood PC, Pickering JE, Givens DI, Gallacher JE. The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: an overview of the evidence. *Lipids* 2010, 45(10):925-39.

Espejo-Carpio FJ, De Bobba C, Guadix A, Guadix EM. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *Int Dairy J* 2013, 32:175-83.

## **F**

FAOSTAT, *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 2011. <http://www.faostat.fao.org>. Último acceso Diciembre 2013.

Farnsworth JP, Li J, Hendricks GM, Guo MR. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Res* 2006, 65:113-21.

Folsom AR, Parker ED, Harnack LJ. Degree of concordance with DASH diet guidelines and incidence of hypertension and fatal cardiovascular disease. *Am J Hypertens* 2007, 20(3):225-32.

Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr* 2013, 109(2):S35-50.

Fuentes S, Egert M, Jiménez-Valera M, Monteoliva-Sánchez M, Ruiz-Bravo A, Smidt H. A strain of *Lactobacillus plantarum* affects segmented filamentous bacteria in the intestine of immunosuppressed mice. *FEMS Microbiol Ecol* 2008, 63(1):65-72.

Fuentes S, Egert M, Jiménez-Valera M, Ramos-Cormenzana A, Ruiz-Bravo A, Smidt H, Monteoliva-Sánchez M. Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Res Microbiol* 2008b, 159(4):237-43.

## **G**

Galdeano CM, Perdigón G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol* 2004, 97(4):673-81.

Geerlings A, Villar IC, Zarco FH, Sánchez M, Vera R, Gomez AZ, Boza J, Duarte J. Identification and characterization of novel angiotensin-converting enzyme inhibitors obtained from goat milk. *J Dairy Sci* 2006, 89(9):3326-35.

Güler-Akin MB, Serdar M. Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk. *Food Chem* 2007, 100:788-93.

## **H**

Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res* 2004, 51:155-63.

Haro AM, Artacho R, Cabrera-Vique C. Linoleic conjugated acid: current interest in human nutrition. *Med Clin* 2006, 127(13):508-15.

Herrero AM, Requena T. The effect of supplementing goats milk with whey protein concentrate on textural properties of set-type yoghurt. *Int J Food Sci Technol* 2006, 41:87-92.

Hess SJ, Roberts RF, Ziegler GR. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizers systems. *J Dairy Sci* 1997, 80:252-63.

Hijano SM. *Estudio de la estabilidad del ADN en situación de anemia ferropénica nutricional. Influencia del consumo de leche de cabra o vaca enriquecida o no en hierro*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2010.

Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutr Cancer* 2009, 61(1):47-69.

## I

Ismail B, Nampoothiri KM. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Arch Microbiol* 2010, 192:1049-57.

## J

Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(11):4949-56.

Janer C, Peláez C, Requena T. Caseinomacropéptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chem* 2004, 86:263-7.

Jiménez A, Cervera P, Bacardí M. Tablas de composición de alimentos. Novartis Consumer Health SA. Barcelona, 2002.

## K

Kehagias C, Csapo J, Konteles S, Kolokitha E, Koulouris S, Csapo-Kiss ZS. Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cow's, ewe's, goat's milk and modified whey powder products. *Int Dairy J* 2008, 18:396-402.

Khani S, Hosseini HM, Taheri M, Nourani MR, Imani Fooladi AA. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012, 11(2):79-89.

Kongo JM, Gomes AM, Malcata FX. Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* in a controlled bioreactor. *Lett Appl Microbiol* 2006, 42:595-9.

## L

Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model atopy. *J Pediatr Gastr Nutr* 2004, 39:354-60.

Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, Concha A, Gálvez J, López-Huertas E, Boza J, Oblad C, Xaus J. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr* 2006, 25(3):477-88.

Lee YY, Tang TK, Lai OM. Health benefits, enzymatic production, and application of medium- and long-chain triacylglycerol (MLCT) in food industries: a review. *Food Sci* 2012, 77(8):R137-44.

Legrain-Raspaud S, Trotin B, Naliboff B, Mayer EA. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* 2013, 144(7):1394-401.

López-Aliaga I, Alférez MJM, Barrionuevo M, Nestares T, Sanz-Sampelayo MR, Campos MS. Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine: beneficial effect of goat milk. *J Dairy Sci* 2003, 86:2958-66.

López-Aliaga I, Alférez MJ, Nestares MT, Ros PB, Barrionuevo M, Campos MS. Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. *J Dairy Sci* 2005, 88(3):1024-30.

López-Aliaga I, Díaz J, Nestares T, Alférez MJM, Campos MS. Calcium-supplemented goat milk does not interfere with iron absorption in rats with anaemia induced by dietary iron depletion. *Food Chem* 2009, 113(3):839-41.

López-Aliaga I, Díaz-Castro J, Alférez MJM, Barrionuevo M, Campos MS. A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection. *Dairy Sci Technol* 2010, 90(6):611-22.

López-Fandiño R, Olano A, Corzo N, Ramos M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *J Dairy Res* 1993, 60(3):339-47.

## **M**

MAGRAMA, *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente* 2011, 2012, 2013. <http://www.magrama.gob.es/es/>. Último acceso Diciembre 2013.

MAPA, *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación* 2008. <http://www.magrama.gob.es/es/>. Último acceso Diciembre 2013.

Maragkoudakis PA, Mountzouris KC, Rosu C, Zoumpopoulou G, Papadimitriou K, Dalaka E, Hadjipetrou A, Theofanous G, Strozzi GP, Carlini N, Zervas G, Tsakalidou E. Feed supplementation of *Lactobacillus plantarum* PCA 236 modulates gut microbiota and milk fatty acid composition in dairy goats — a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 2010, 141:S109-S116.

Martemucci G, D'Alessandro AG. Progress in nutritional and health profile of milk and dairy products: a novel drug target. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2013, 13(3):209-33.

Martín-Diana AB, Janer C, Peláez C, Requena T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria A.B. *Int Dairy J* 2003, 13:827-33.

Martínez-Férez A, Rudloff S, Guadix A, Henkel GA, Pohlentz G, Boza JJ, Guadix EM, Kunz C. Goat's milk is a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. *Int Dairy J* 2005, 16:173-81.

Martínez-Villaluenga M, Gomez R. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *Int Dairy J* 2007, 17:116-22.

Mataix-Verdú FJ. *Tabla de composición de alimentos*. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Granada. Granada, 2009.

Mehaia MA, El-Khadragy SM. Physicochemical characteristics and rennet coagulation time of ultrafiltered goat milk. *Food Chem* 1998, 62:257-63.

MERCASA, 2007. *Informe Mercasa 2007: consumo y alimentación en España*. <http://nutriguia.com/art/30bea967.html>. Último acceso Diciembre 2013.

Minervini F, Bilancia MT, Siragusa S, Gobbetti M, Caponio F. Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiol* 2009, 26:559-64.

Mlobeli NT, Gutierrez NA, Maddox IS. Physiology and kinetics of *Bifidobacterium bifidum* during growth on different sugars. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998, 50:125-8.

Montrose DC, Floch MH. Probiotics used in human studies. *J Clin Gastroenterol* 2005, 39(6):469-84.

Moreira O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. *Tabla de composición de alimentos*. Ed. Pirámide. Madrid, 2011.

## **N**

Nagpal R, Behare PV, Kumar M, Mohania D, Yadav M, Jain S, Menon S, Parkash O, Marotta F, Minelli E, Henry CJ, Yadav H. Milk, milk products, and disease free health: an updated overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012, 52(4):321-33.

Nikooyeh B, Neyestani TR, Farvid M, Alavi-Majd H, Houshiarrad A, Kalayi A, Shariatzadeh N, Gharavi A, Heravifard S, Tayebinejad N, Salekzamani S, Zahedirad M. Daily consumption of vitamin D- or vitamin D + calcium-fortified yogurt drink improved glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2011, 93(4):764-71.

Nissle, A. Weiteres über die Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung. *Dtsch Med Wochenschr* 1925, 44:1809-13.

Novakovic P, Kordic J, Slacanac V, Moslavac T. Rheological changes during fermentation with bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Mljekarstvo* 1997, 47:93-101.

Novakovic P, Kordic J, Slacanac V. Rheological properties of goat's and cow's acidophilus milk during storage. *Mljekarstvo* 1998, 48:75-86.

## O

Olalla M, Ruiz-López MD, Navarro M, Artacho R, Cabrera C, Giménez R, Rodríguez C, Mingorance R. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of comercial milk. *Food Chem* 2009, 113:835-8.

Oliveira MN, Sodini I, Remeuf F, Corrieu G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *Int Dairy J* 2001, 11:935–942.

Østlie HM, Helland MH, Narvhus JA. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *Int J Food Microbiol* 2003, 87(1-2):17-27.

Özer BH, Kirmaci HA. Functional miles and dairy beverages. *Int Journal Dairy Technol* 2010, 63(1):1-15.

## P

Pandya AJ, Ghodke KM. Goat and sheep milk product other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Res* 2007, 68:193-206.

Park YW, Haenlein GFW. *Goat milk. Chemistry and nutrition*. En: Park YW (Ed.) *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Blackwell Publishing. Oxford, 2006.

Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 2006, 100(6):1171-85.

Peng Y, Serra M, Horne DS, Lucey JA. Effect of fortification with various types of milk proteins on the rheological properties and permeability of nonfat set yogurt. *J Food Sci* 2009, 74(9):C666-73.

Perrin S, Warchol M, Grill JP, Scheider F. Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *J Appl Microbiol* 2001, 90:859-65.

Pirisi A, Lauret A, Dubeuf JP. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Rumin Res* 2007, 68:167-78.

Prins WA, Botha M, Botes M, de Kwaadstenier M, Endo A, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* 24, isolated from the marula fruit (*Sclerocarya birrea*), has probiotic properties and harbors genes encoding the production of three bacteriocins. *Curr Microbiol* 2010, 61:584-9.

Prosser CG, McLaren RD, Frost D, Agnew M, Lowry DJ. Composition of the non-protein nitrogen fraction of goat whole milk powder and goat milk-based infant and follow-on formulae. *Int J Food Sci Nutr* 2008, 59(2):123-33.

Puertollano E, Puertollano MA, Cruz-Chamorro L, Álvarez de Cienfuegos G, Ruiz-Bravo A, De Pablo MA. Orally administered *Lactobacillus plantarum* reduces pro-inflammatory interleukin secretion in sera from *Listeria monocytogenes* infected mice. *Br J Nutr* 2008, 99(4):819-25.

Puertollano E, Puertollano MA, Cruz-Chamorro L, De Cienfuegos GA, Ruiz-Bravo A, De Pablo MA. Effects of concentrated supernatants recovered from *Lactobacillus plantarum* on *Escherichia coli* growth and on the viability of a human promyelocytic cell line. *J Appl Microbiol* 2009, 106(4):1194-203.

Puertollano E, De Cienfuegos GA, Ruiz-Bravo A, De Pablo MA, Puertollano MA. Culture supernatants from *Lactobacillus plantarum* induce necrosis on a human promyelocytic leukemia cell line. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2013, 13(2):195-203.

## Q

Quintana V. *Caracterización fisicoquímica y nutricional de leches fermentadas de cabra*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2011.

Quiros A, Hernandez-Ledesma B, Ramos M, Amigo L, Recio I. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J Dairy Sci* 2005, 88:3480-7.

## R

Raynal-Ljutovac K, Gaborit P, Lauret A. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Rumin Res* 2005, 60:167-77.

Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y. Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Ruminant Res* 2008, 79:57-72.

Real Decreto 179/2003, de 14 de febrero, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur. BOE núm. 42, 18 Febrero 2003.

Remeuf F, Mohammed S, Sodini JP, Tissier JP. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *Int Dairy J* 2003, 13:773-82.

Rettger LF, Levy MN, Weinstein L, Weiss JE. *Lactobacillus acidophilus* and its therapeutic application. *Ann Intern Med* 1936, 10(2):274-5.

Ribeiro AC y Ribeiro SDA. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Res* 2010, 89:225-33.

Ricci I, Artacho R, Olalla M. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010, 50(5):390-402.

Richardson CW. *Let's learn about dairy goats and goat's milk*. Oklahoma Cooperative Extension Service (Oklahoma State University), boletín N° 424. Oklahoma, 2004.

Rivas F, Jiménez R, Díaz L. Aspectos nutricionales de la leche de cabra y sus positivos efectos sobre la salud humana. *Nutr Hosp* 2005, 20(1):1.

Robinson PH, Fredeen AH, Chalupa W, Julien WE, Sato H, Fujieda T, Suzuki H. Ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows fed a diet designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *J Dairy Sci* 1995, 78(3):582-94.

Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D, Britten M. Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *J Dairy Sci* 2012, 95:1-8.

Rojas-Castro WN, Chacón-Villalobos A, Pineda-Castro ML. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. *Agronomía Mesoamericana* 2007, 18(2):221-37.

Romero RS, Mestres J. *Leches fermentadas*. En: *Productos lácteos. Tecnología*. Ediciones de la Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, 2004.

Roy D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int J Food Microbiol* 2001, 69:167-82.

## S

Saarela M, Rantala M, Hallamaa K, Nohynek L, Virkajarvi I, Matto J. Stationary-phase acid and heat-treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 2004, 96:1205-14.

Saarela M, Virkajärvi I, Nohynek L, Vaari A, Mättö J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *Int J Food Microbiol* 2006, 112(2):171-8.

Saarela MH, Alakomi HL, Puhakka A, Mättö J. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *J Appl Microbiol* 2009, 106:1204-12.

SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos), 2009. <http://informes.acabase.com.ar/Lists/SAGPYA%202009/AllItems.aspx>. Último acceso Diciembre 2013.

Sánchez B, De los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M. Probiotic fermented milks: present and future. *Int J Dairy Technol* 2009, 62(4):472-83.

Sanz L. *Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo e inmunológico*. Memoria de Tesis doctoral. Universidad de Granada, 2007.

Sanz L, Ramos E, De La Torre G, Díaz-Castro J, Pérez-Martínez L, Sanz-Sampelayo MR. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compos Anal* 2009, 22:322-9.

Shah NPF. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J* 2007, 17:1262-77.

Silanikove N, Leitner G, Mernic U, Prosser CG. Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Res* 2010, 89:110-24.

Slacanac V, Hardi J, Pavlovic H, Vukovic D, Cutic V. Inhibitory effect of goat and cow milk fermented by ABT-2 culture (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Streptococcus thermophilus*) on the growth of some uropathogenic *E. coli* strains. *Ital J Food Sci* 2004, 16:209-19.

Slacanac V, Hardi J, Curzik D, Pavlovic H, Juki M. Production of antibacterial organic acids during the fermentation of goat and cow milk with *Bifidobacterium longum* Bb-46. *Acta Aliment* 2005, 34:277-85.

Slacanac V, Bozanic R, Hardi J, Szabo JR, Lucan M, Krstanovic V. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int J Dairy Technol* 2010, 63(2):171-89.

Stack HM, Kearney N, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76(2):500-7.

Staff MC. *Leches fermentadas y quesos frescos*. En: Early R (Ed.) *Tecnología de los productos lácteos*. Editorial Acribia. Zaragoza, 2000.

Staffolo M, Bertola N, Martino M, Bevilacqua A. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *Int Dairy J* 2004, 14:263-8.

Stephenie W, Kbeir BM, Shuhimi M, Rosfarizan M, Yazid AM. Growth and optimization of a probiotic candidate, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4, in milk medium using response surface methodology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2007, 12:106-13.

**T**

Tamime AY, Marshall VME. *Microbiology and technology of fermented milks*. En: Law BA (Ed.) *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Blackie Academic and Professional. London, 1997.

Tannock GW. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol* 1999, 1(1-2):53-64.

Tratnik L, Bozanic R, Herceg Z, Drgalic I. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *Int Journal Dairy Technol* 2006, 59:40-6.

Tremblay A, Gilbert JA. Milk products, insulin resistance syndrome and type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr* 2009, 28(1):91S-102S.

**V**

Van Meijl LE, Mensink RP. Low-fat dairy consumption reduces systolic blood pressure, but does not improve other metabolic risk parameters in overweight and obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011, 21(5):355-61.

Vargas M, Chafer M, Albors A, Chiralt A, González-Martínez C. Physico-chemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cow's and goat's milk. *Int Dairy J* 2008, 18:1146-52.

Vegarud GE, Devold TG, Opheim R, Loeding E, Svenning C, Abrahamsen RK, Lien S, Langsrud T. Genetic variants of Norwegian goat's milk composition, micellar size and renneting properties. *Int Dairy J* 1999, 9:367-8.

Villalta J, Monferrer A. Propiedades funcionales del lactosuero y sus proteínas. *BDN S.L.* 2001, Boletín N°29.

**W**

Wang YC, Yu RC, Chou CC. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiol* 2002, 19:501-8.

**Z**

Zhang D, Lovitt RW. Performance assessment of malolactic fermenting bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus brevis* in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006,69:658-64.

# CAPÍTULO II

## Estudio de la biodisponibilidad de minerales





# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	101
1.1. Concepto de biodisponibilidad de un nutriente.....	103
1.2. Factores que influyen en la biodisponibilidad de minerales.....	104
1.3. Métodos de evaluación de la biodisponibilidad mineral.....	110
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	119
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	123
3.1. Instrumentación .....	125
3.2. Reactivos y disoluciones.....	126
3.3. Muestras.....	129
3.4. Ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> : fracción soluble.....	129
3.5. Ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> : fracción dializable .....	133
3.6. Ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> : fracción transportada y captada.....	138
• Mantenimiento en cultivo de la línea celular .....	138
Recuento celular .....	139
Observación de la morfología celular .....	140
• Ensayos de viabilidad celular .....	141
Método de tinción con rojo neutro .....	141
Método de tinción con azul tripán.....	142
• Ensayos de actividad metabólica celular .....	142
• Siembra de las células Caco-2 en placas bicamerales .....	143
Integridad y confluencia de la monocapa .....	144
• Ensayos de transporte y captación.....	145
3.7. Determinación de Ca, Mg, P y Zn .....	146
• Mineralización de las muestras.....	147
• Determinación de Ca, Mg y Zn por ICP-AES.....	148
• Determinación de P por espectrofotometría UV/VIS.....	149
• Exactitud y precisión de los análisis .....	150
3.8. Cálculo de la biodisponibilidad de minerales.....	150
3.9. Estudio estadístico.....	152

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	153
4.1. Cantidad total de Ca, Mg, P y Zn en las leches fermentadas.....	155
4.2. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> .....	159
• Ensayos de viabilidad y actividad metabólica celular.....	160
• Integridad y confluencia de la monocapa .....	162
• Calcio .....	163
• Magnesio .....	169
• Fósforo.....	172
• Zinc .....	175
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	181
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	185

# 1. INTRODUCCIÓN





### 1.1. Concepto de biodisponibilidad de un nutriente

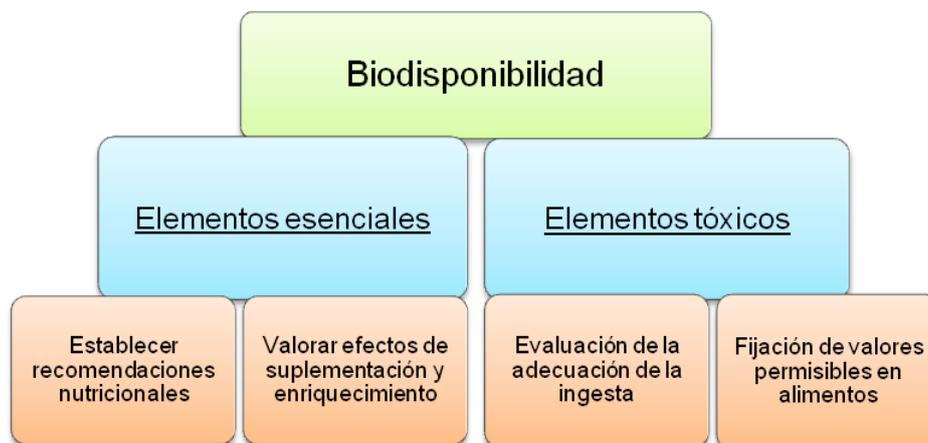
El concepto de **biodisponibilidad** de un nutriente, también llamada disponibilidad biológica, se ha ido modificando con el tiempo. En 1987 se definió como “la fracción de nutriente que se digiere, absorbe y metaboliza por las vías normales” (Fairweather-Tait, 1987). Dos años más tarde, se propuso definir el término biodisponibilidad como “el porcentaje de nutriente capaz de ser absorbido y disponible para ser almacenado” o simplemente “el porcentaje de nutriente que puede ser utilizado por el organismo” (Bender, 1989). Schlemmer (1995) la definió como “la efectividad por la cual los nutrientes, en una forma química determinada, son liberados de los alimentos en presencia de ciertos componentes dietéticos”. En general, se emplea el término biodisponibilidad para describir la absorción y utilización de un nutriente por las células del organismo, entendiendo que la utilización real comprende los procesos de transporte, asimilación celular y transformación en la forma biológicamente activa (O’Dell, 1984).

La cantidad total de un nutriente en un alimento no refleja la cantidad que se encuentra disponible para ser absorbida y utilizada por el organismo, sólo una cierta cantidad se encuentra biodisponible, y en el caso de los minerales ésta oscila entre un 1% y un 90%, mientras que aquella fracción de nutriente no utilizada es eliminada. Por tanto, para estimar la eficacia del aporte de un elemento traza a través de la ingesta dietaria, no basta con determinar el contenido total, sino que es preciso conocer la cantidad absorbida y utilizada, o sea su biodisponibilidad. La biodisponibilidad mineral ha ganado un creciente interés en el campo de la nutrición (Frontela-Saseta, 2007; Cabrera-Vique y col., 2011b; Bergillos-Meca y col., 2013).

La **bioaccesibilidad** es un término relacionado, que se definió como “la fracción soluble de un nutriente que está presente en el lumen intestinal y disponible para su absorción” (Perales y col., 2007). Este término representa el porcentaje de nutriente transformado en forma absorbible en el tracto digestivo (Ortega y col., 2009; Bergillos-Meca y col., 2013).

Los estudios de biodisponibilidad proporcionan datos útiles para ayudar a prevenir insuficiencias nutricionales de elementos esenciales, estableciendo de una forma más precisa las recomendaciones nutricionales y valorando los efectos de la suplementación y enriquecimiento de ciertos nutrientes en determinados alimentos. Se contribuye así a completar las tablas de composición de alimentos, en las que la información de nuevos alimentos funcionales es aún escasa. Además, se consigue una mejor evaluación de los elementos tóxicos, fijando así los contenidos máximos en alimentos (Hurrell y col., 1989;

Turpin y col., 2011; Bergillos-Meca y col., 2013). La figura 14 muestra las posibles aplicaciones de los estudios de biodisponibilidad en el caso de minerales.



**Figura 14.** Posibles aplicaciones de la evaluación de la biodisponibilidad de minerales en alimentos o dietas.

## 1.2. Factores que influyen en la biodisponibilidad de minerales

La biodisponibilidad mineral se ve afectada tanto por la condición fisiológica de la persona como por factores dietéticos (Frontela-Saseta, 2007).

### • Factores fisiológicos o intrínsecos

- Especie animal.
- Edad y sexo.
- Características genéticas y errores metabólicos.
- Estado nutricional.
- Necesidades anabólicas (crecimiento, embarazo, lactación).
- Estados patológicos.
- Microbiota intestinal.
- pH de los jugos gástrico e intestinal.
- Estado redox en el lumen intestinal.
- Secreción intestinal.
- Motilidad intestinal.
- Efectos endocrinos.
- Capacidad del organismo para adaptarse a variaciones en el aporte de nutrientes.

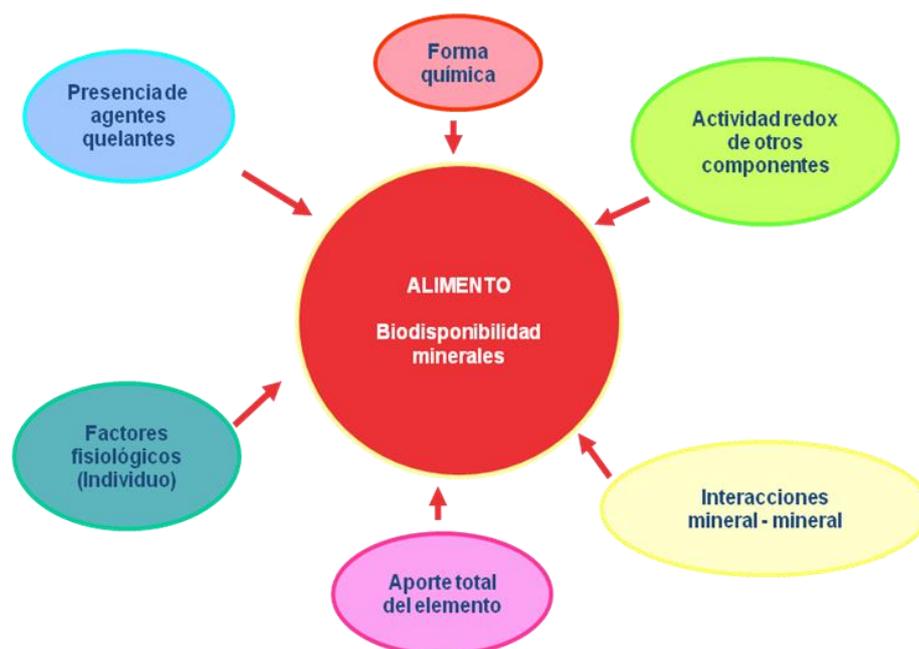
- Mecanismos homeostáticos a corto plazo (mediados a través de las células de la mucosa intestinal).
- Infecciones y estrés.

•**Factores dietéticos o extrínsecos**

- Aporte total del elemento en la dieta.
- Forma química del elemento (formas ionizadas, estados de oxidación, complejos más o menos estables, etc.).
- Propiedades físicas: solubilidad, capacidad de adsorción sobre componentes inertes del alimento, tamaño de partícula.
- Propiedades químicas: reacciones con otros componentes del alimento, formación de compuestos poco solubles y complejos, reacciones redox, etc.
- Propiedades bioquímicas, sobre todo la capacidad de competir con otros elementos por puntos activos del organismo.
- Presencia de potenciadores de la absorción: ascorbato, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, péptidos, ácidos grasos, etc.
- Presencia de inhibidores de la absorción: fosfatos, fitatos, polifenoles, oxalato, carbonato, etc. También inhibidores competitivos para la unión con una proteína transportadora o con los sitios de absorción.

Diversos autores han concluido que algunos minerales, presentes en la dieta, interaccionan con nutrientes que influyen en su absorción, como pueden ser otros minerales, fitato, ácido ascórbico, proteínas, ácidos grasos libres, etc. (Cámara y col., 2005; Velasco-Reynold y col., 2010). El grado en que se producen estas interacciones depende, en parte, de la temperatura y de los procedimientos aplicados en el procesado y conservación de los alimentos. Por ejemplo, estudios recientes demuestran que dietas ricas en compuestos químicos derivados de la reacción de Maillard reducen la biodisponibilidad de minerales (Mesías y col., 2009).

En cualquier caso, no siempre se pueden separar los factores extrínsecos de los intrínsecos, ya que existe una estrecha relación entre la dieta y la respuesta fisiológica del organismo (Martínez y col., 1996). Los factores más importantes que influyen en la biodisponibilidad de minerales se resumen en la figura 15.



**Figura 15.** Factores que influyen en la biodisponibilidad de minerales.

En el caso del **calcio** (Ca), se ha observado que la caseína, algunos aminoácidos, la vitamina D, los fructooligosacáridos, la lactosa y algunas situaciones como embarazo o pérdidas óseas de este mineral promueven su absorción (Jensen y col., 2001; Erba y col., 2002; Bass y col., 2006), mientras que los alimentos ricos en fitatos, oxalatos, taninos y compuestos con actividad quelante, así como las restricciones energéticas pueden disminuirla (Cifuentes y col., 2002; Mesías, 2007).

Haag y col. (2003) concluyeron que una relación ácidos grasos insaturados/saturados elevada en la dieta parece tener efectos beneficiosos sobre la absorción de este mineral. Existe también una relación entre la absorción del Ca y del P, que deben estar en una proporción entre 1:1,2 y 1:1,4.

El Ca, a su vez, puede modificar la absorción intestinal de otros minerales como Fe y Zn.

Campos y col. (2003) observaron *in vivo* que la leche de cabra facilitó la absorción y utilización de Ca en comparación con la leche de vaca, concluyendo que la procedencia del mineral es un factor clave para su absorción.

Diversos autores han descrito un incremento en la biodisponibilidad de Ca causado por microorganismos probióticos (Pérez-Conesa y col., 2006; Kruger y col., 2009; Rekha y col., 2010). Dicho incremento puede diferir dependiendo de la cepa utilizada. Bergillos-Meca y col. (2013) observaron *in vitro* que, aunque el contenido de Ca era menor en

leche fermentada con *Lactobacillus fermentum* D3, la biodisponibilidad fue mayor, en comparación con leches fermentadas con otros probióticos.

Con respecto al **magnesio** (Mg), también se ha estudiado el efecto de distintos factores sobre su biodisponibilidad. Por ejemplo, los vegetales crudos son una buena fuente de Mg bioaccesible. Recientemente, se ha mostrado que la biodisponibilidad *in vitro* de este mineral está relacionada con su contenido total en la dieta y los niveles de Ca, Zn y Cr pueden incrementar su absorción (Velasco-Reynold y col., 2010). Vitali y col. (2008) concluyeron que los fitatos y los polifenoles limitan la solubilidad del Mg y disminuyen su bioaccesibilidad.

También se ha observado que algunos probióticos pueden aumentar su biodisponibilidad, debido probablemente a que el efecto fermentativo del microorganismo podría incrementar los niveles de sustancias quelantes que son capaces de mantener estos minerales en forma soluble (Bergillos-Meca y col., 2013). Moreno y col. (1995) encontraron una mayor biodisponibilidad de Mg en productos fermentados de leche de cabra, que en los de leche de vaca. López-Aliaga y col. (2003) indican que la leche de cabra presenta una mejor utilización nutricional de Mg en ratas.

La absorción del **fósforo** (P) está también influenciada por diversos factores. Campos y col. (2003) demostraron que la leche de cabra facilita la absorción de este mineral en ratas sanas y en ratas con resección intestinal, mientras que ni la leche de vaca ni una dieta sin leche consiguieron ese efecto. Bergillos-Meca y col. (2013) observaron una mayor biodisponibilidad *in vitro* de P en leches fermentadas con *L. fermentum* D3, frente a otros microorganismos probióticos.

Pérez-Llamas y col. (2001) encontraron una mayor fracción dializada de P en fórmulas infantiles a base de proteína de leche de vaca, que en otras a base de soja. Estos autores observaron que la biodisponibilidad *in vitro* de P también aumentó en fórmulas infantiles con proteínas hidrolizadas, frente a fórmulas convencionales de leche de vaca (Pérez-Llamas y col., 2003).

En el caso del **zinc** (Zn), se ha demostrado que el tratamiento térmico de la caseína en presencia de glucosa-fructosa, así como el fitato tienen una influencia negativa sobre su biodisponibilidad (Seiquer y col., 2000; Lonnerdal y col., 2002).

Diversos autores han mostrado un mejor uso nutricional de Zn proveniente de leche de cabra y sus derivados, frente a la de vaca; Bergillos-Meca y col. (2013) observaron una mayor biodisponibilidad *in vitro* en leches de cabra fermentadas y Alférez y col. (2003)

encontraron mayor biodisponibilidad *in vivo* tras la inclusión en la dieta de leche de cabra frente al consumo de leche de vaca. Díaz-Castro y col. (2009) estudiaron el efecto de leches de cabra y vaca enriquecidas en Ca sobre la utilización y depósito en órganos diana de Zn en ratas con anemia, llegando a la misma conclusión, una mayor biodisponibilidad del mineral cuando la leche era caprina. Esto podría ser debido a que la leche de cabra tiene mayor cantidad de vitamina D y C, cisteína y ácidos grasos de cadena media, que podrían facilitar el transporte, absorción y metabolismo del Zn. La absorción de este mineral también puede ser incrementada gracias a distintos microorganismos probióticos (Chian y col., 2012; Bergillos-Meca y col., 2013).

La absorción del **hierro** (Fe) hemo y no hemo se realiza por mecanismos distintos, viéndose afectados por diversos factores potenciadores o inhibidores. En general, aunque la proporción del Fe hemo en la dieta es menor, su absorción es mayor, debido a su estructura porfirínica. En individuos deficientes en Fe o que consumen dietas con gran cantidad de potenciadores de la absorción, la biodisponibilidad de la forma no hemo puede alcanzar valores mayores (Mesías, 2007).

La proporción del Fe en la dieta juega un importante papel en la absorción del mismo en el organismo. El ácido ascórbico es el mayor potenciador de su absorción, pero también lo hacen la vitamina A y el  $\beta$ -caroteno, las proteínas animales y otros factores como la procedencia del mineral o la deficiencia de Fe (Baech y col., 2003; Tetens y col., 2005; Alférez y col., 2006). Por otro lado, se ha observado que los fitatos, los polifenoles, la fibra dietética y las fosfoproteínas llevan a una disminución de la absorción de este mineral (Mesías, 2007; Vitali y col., 2007). También se han visto interacciones con otros minerales, como el Ca y el Zn, dependiendo los efectos inhibitorios de las dosis (Mesías, 2007).

Con respecto al **cobre** (Cu), se ha demostrado que la fibra de la dieta está normalmente asociada con una disminución en su biodisponibilidad, aunque este efecto negativo no es tan severo como con otros cationes divalentes como Ca y Zn. Por otro lado, las proteínas actúan como potenciadores de la absorción de Cu, aunque la naturaleza de la fuente proteica o los cambios en el tamaño y estructura de las proteínas que ocurren durante el procesado de los alimentos podrían afectar a la asimilación del mismo (Vitali y col., 2010).

Para el **cromo** (Cr), la naturaleza del anión que forma las sales de Cr y el estado nutricional del individuo son factores que determinan la eficiencia de su absorción en el tracto gastrointestinal. La biodisponibilidad de este mineral puede depender también de interacciones con otros componentes de la dieta, incluyendo otros minerales, y se han observado interdependencias tanto competitivas como cooperativas. Además, el contenido de Cr en la dieta puede influir en su absorción, pues se ha observado que en dietas con bajos niveles, la fracción dializable es mayor que cuando la dieta contiene niveles intermedios. Para niveles altos, se vio un incremento en la fracción dializable (García y col., 2001; Cabrera-Vique y col., 2011a).

Con respecto al **manganeso** (Mn), se ha observado que los fitatos y los polifenoles limitan su solubilidad (Vitali y col., 2008). Cabrera-Vique y col. (2009) no observaron correlaciones entre la fracción dializada y el contenido total en la dieta. Velasco-Reynold y col. (2008a) comprobaron que la absorción del Mn podía oscilar entre 1 y 16%, y que está afectada por diferentes factores como su concentración y forma química, procedencia, estado de oxidación, contenido del lumen intestinal, etc. Estos autores indicaron también que alimentos ricos en proteínas y carbohidratos podrían ser fuente de Mn bioaccesible en la dieta.

La absorción del **aluminio** (Al) puede verse afectada por compuestos presentes en la dieta, como pueden ser ácido cítrico, fosfato o fluoruro (Cabrera-Vique y col., 2013a). Se ha descrito que la fracción soluble podría ir desde 0,001% hasta 24% en humanos y que la absorción de éste es difícil de estimar. Además, se pueden producir reacciones de competición entre Al y otros iones como Ca, Mg o Fe (López y col., 2002).

Poco es sabido sobre las formas químicas del **níquel** (Ni) y su biodisponibilidad en la dieta (Cempel y col., 2006). Recientemente, se ha observado una correlación entre el contenido de Ni y la fracción dializada. La absorción de este micronutriente puede estar influenciada por la acidez en el intestino y la presencia de compuestos que se pueden unir a él y hacerlo menos disponible para ser absorbido (Cabrera-Vique y col., 2011b).

En cuanto al **selenio** (Se), diversos autores han demostrado *in vivo* que la inclusión de leche de cabra en la dieta tiene un importante efecto beneficioso sobre su biodisponibilidad (Alfárez y col., 2003; Barrionuevo y col., 2003). El contenido total en el alimento influye de forma positiva en su bioaccesibilidad; Wang y col. (2013b) observaron un aumento de ésta tras enriquecer los granos de arroz con Se.

### 1.3. Métodos de evaluación de la biodisponibilidad mineral

Los métodos utilizados para la determinación de la biodisponibilidad mineral se dividen en tres grandes grupos: métodos *in vivo*, métodos de digestión *in vitro* y métodos *in vitro* con cultivos celulares.

#### • Métodos *in vivo*

##### *Ensayos en humanos*

- Balance químico. Este método es uno de los más utilizados. Consiste en evaluar la diferencia entre la cantidad ingerida y excretada durante un cierto periodo de tiempo. Como ventajas, señalar la no exposición de los sujetos a compuestos peligrosos y su fácil realización. El principal inconveniente radica en diferenciar en la muestra de heces el elemento no absorbido de origen dietético de la excreción endógena (Van Campen y col., 1999).

Rodriguez-Mateos y col. (2013) realizaron una intervención con el objetivo de estudiar la absorción y metabolismo de polifenoles a distintos tiempos tras el consumo de una bebida de arándanos; observaron mayores concentraciones de ácidos fenólicos en plasma tras 1, 2 y 6 horas tras la administración, que coincidieron con notables mejoras en la función vascular, en comparación con una bebida control. Mesías (2007) empleó el balance químico para estudiar la influencia del consumo de productos de la reacción de Maillard en la absorción y metabolismo de Ca y Fe en adolescentes.

- Isótopos radioactivos. Su uso comenzó en 1935 y los primeros estudios fueron efectuados con  $^{13}\text{C}$ . La principal ventaja es que, al suministrar dos isótopos radioactivos del mismo elemento, uno vía oral y otro vía parenteral, el destino metabólico de los nutrientes en una dieta o alimento, puede ser distinguido de los minerales aportados por otras fuentes, determinándose así la excreción endógena. Los primeros marcadores isotópicos para el estudio de minerales fueron radioisótopos, empleándose en estudios metabólicos humanos sobre Fe, Cu, Ca, Mg y Zn. También tiene inconvenientes, entre ellos, el riesgo de exposición en humanos, especialmente en ciertos grupos de población como niños y mujeres embarazadas (López, 1998; Liu y col., 2007).

Este método ha sido empleado por Höllriegl y col. (2004) para investigar la cinética del estroncio (Sr) en humanos, y la influencia que puede tener la administración conjunta de alginato sobre su absorción. Describieron que los

alginatos pueden ser un potente factor nutricional para reducir la absorción del Sr, representando un método simple de protección frente a alimentos contaminados por vertidos accidentales. Lin y col. (2013) evaluaron la absorción, metabolismo y excreción de un fármaco en adultos utilizando el isótopo radioactivo  $^{14}\text{C}$ .

- Isótopos estables. Éstos son adicionados a los alimentos o dieta y la absorción es normalmente determinada mediante monitorización en las heces. Su principal ventaja es que no presentan ningún riesgo para la salud. Pueden emplearse diversos isótopos del mismo compuesto, y varios compuestos pueden ser estudiados de forma conjunta (López, 1998). El uso de isótopos estables para estudios de biodisponibilidad ha crecido en los últimos años, incrementándose su aplicación en estudios bromatológicos y nutricionales. Sin embargo, presentan ciertos inconvenientes como su elevado precio, dificultad del marcaje, reducida disponibilidad y análisis laboriosos. A todo ello se debe añadir un problema básico, y es que la cantidad de isótopo que debe añadirse para un análisis exacto es a menudo, demasiado elevada para considerarlo un marcador y puede perturbar el sistema (Barberá y Farré, 1992; López, 1998; Liu y col., 2007; Uchida y col., 2013).

Wang y col. (2013) estudiaron la biodisponibilidad de Ca en un suplemento, utilizando un isótopo estable vía oral y otro vía intravenosa. También se utilizaron isótopos estables para evaluar la influencia de la fitasa sobre la biodisponibilidad de Fe y Zn, concluyendo que ésta aumentaba la absorción de minerales (Troesch y col., 2013).

Rosado y col. (2005) estudiaron la influencia que la adición de leche y yogur a una dieta basada en verduras puede tener sobre la biodisponibilidad de Zn y Fe en mujeres, marcando éstos con isótopos estables. Concluyeron que tanto la leche como el yogur incrementaron la biodisponibilidad de Zn, aunque la del Fe no se vió afectada.

El Sr estable se propuso como una técnica de determinación para la absorción de Ca en adultos. Se administró un isótopo radioactivo de Ca y uno estable de Sr y se relacionaron la absorción y cinética de ambos, sugiriendo que los ensayos con Sr se podrían convertir en un método de elección para estudiar la absorción de Ca en la población (Jovanovic y col., 1994).

Schwab y col. (2013) han desarrollado una técnica para caracterizar la absorción, distribución, metabolismo y excreción, que combina la administración oral de un fármaco marcado con un isótopo radioactivo, y la administración intravenosa del mismo marcado con un isótopo estable.

Aunque el modo ideal de estudiar la biodisponibilidad mineral de los alimentos sería emplear modelos *in vivo*, su aplicación se hace realmente difícil, pues supone el desarrollo de ensayos clínicos caros, laboriosos y difíciles de llevar a cabo con precisión.

### *Ensayos con animales de experimentación*

El uso de modelos animales para predecir la biodisponibilidad representa una alternativa adecuada y han sido ampliamente utilizados en el campo de la nutrición. El principal problema de este tipo de ensayos, además del sufrimiento del animal, es que no constituye siempre un modelo óptimo de la absorción intestinal en humanos (Perales y col., 2006; Frontela-Saseta, 2007; López-Aliaga y col., 2009).

Diversos autores han estudiado los efectos beneficiosos de la leche de cabra sobre la biodisponibilidad de minerales en ratas (Alfárez y col., 2003; Barrionuevo y col., 2003; McKinnon y col., 2010) así como también en lechones de 3 semanas de edad (Rutherford y col., 2006). Díaz-Castro y col. (2009) evaluaron los efectos de leche de vaca y cabra suplementadas con Ca sobre el estado de Zn en ratas con anemia.

Se estudió el efecto de ciertos microorganismos probióticos sobre la absorción mineral en ratas ovariectomizadas (Kruger y col., 2008). Roncero-Ramos y col. (2012, 2013) investigaron los efectos de los productos de la reacción de Maillard sobre la biodisponibilidad y metabolismo de distintos minerales.

### • **Métodos de digestión *in vitro***

La absorción intestinal es un proceso complejo, influenciado por diversos factores. La permeabilidad, que es la velocidad a la que una molécula es transportada a través de una membrana, es el resultado de la participación de mecanismos transportadores (activos y/o pasivos), el balance entre rutas bidireccionales y el metabolismo celular. Un modelo válido para predecir la absorción intestinal debería ser capaz de reproducir todos estos procesos (Turco y col., 2011).

Como alternativa a los estudios *in vivo*, se han propuesto modelos *in vitro* para calcular el porcentaje de nutriente que es transformado en la forma absorbible en el

tracto digestivo (bioaccesibilidad) (López y col., 2002; Cabrera-Vique y col., 2011a). Estos métodos son más rápidos, sencillos, normalmente económicos, permiten controlar fácilmente las variables experimentales y se obtiene una mejor reproducibilidad que en los estudios *in vivo*.

Se basan generalmente en simular las digestiones gástrica e intestinal bajo unas condiciones de ensayo estandarizadas como pH, adición de enzimas y temperatura. Tras el proceso de digestión, se puede estimar la fracción de elemento soluble o dializable, que teóricamente es captada por las células de la mucosa intestinal (Frontela-Saseta, 2007; Velasco-Reynold y col., 2010; Bergillos-Meca y col., 2013). La estimación *in vitro* de la biodisponibilidad mineral implica una digestión gastrointestinal simulada del alimento con pepsina a pH 2 y pancreatina-sales biliares a pH neutro, y posterior medida de la fracción del elemento soluble o bien que dializa a través de una membrana semipermeable, con un determinado tamaño de poro (Jovaní y col., 2001; Cabrera-Vique y col., 2011b). Por tanto, los métodos *in vitro* se pueden utilizar para determinar la fracción soluble (o bioaccesible) y la fracción dializable.

#### *Estimación de la fracción soluble o bioaccesible*

Partiendo de la premisa de que un mineral para ser absorbido debe estar en forma soluble, tras simular la digestión gastrointestinal, se determina la cantidad de elemento soluble presente en el sobrenadante obtenido por centrifugación del digerido (Perales y col., 2007; Seiquer y col., 2010).

Estos métodos están siendo ampliamente empleados. Por ejemplo, Cámara y col. (2005) estimaron la bioaccesibilidad de Ca, Fe, Zn y Cu en menús de colegio y Perales y col. (2006) la fracción bioaccesible de Zn en alimentos infantiles. Estos mismos autores, estimaron también la biodisponibilidad *in vitro* de Fe en fórmulas a base de leche y en zumos de frutas con leche y cereales (Perales y col., 2007). García-Nebot y col. (2010) evaluaron el efecto de la adición de leche o de fosfopéptidos de caseína sobre la biodisponibilidad de Fe.

Seiquer y col. (2000) investigaron la influencia del tratamiento térmico de la caseína en presencia de azúcares reductores en la solubilidad del Zn. Más tarde, estudiaron los efectos del calentamiento de la leche sobre la biodisponibilidad de Ca (Seiquer y col., 2010). Frontela-Saseta (2007) estudió el efecto de la adición de fitasa sobre la biodisponibilidad mineral *in vitro* en papillas infantiles.

### *Estimación de la fracción dializable*

Estos métodos también se basan en la simulación de la digestión gastrointestinal, pero incorporan una membrana de diálisis durante el proceso para simular una difusión pasiva a través de la mucosa intestinal. Los resultados se expresan como fracción dializada (López y col., 2002; Bergillos-Meca y col., 2013).

Diversos autores han empleado este método; Jovaní y col. (2003) determinaron la fracción dializable de Fe en fórmulas infantiles a base de leche y a base de soja. De igual forma, la biodisponibilidad mineral *in vitro* en productos lácteos fue estimada por Cabrera-Vique y col. (1996) y Pérez y col. (2002).

Pérez-Llamas y col. (2001, 2003) evaluaron la influencia de proteínas e hidrolizados proteicos sobre la dializabilidad de aminoácidos y minerales en fórmulas infantiles. Velasco-Reynold y col. (2008a, 2008b, 2009, 2010) determinaron la bioaccesibilidad de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cr en menús servidos en un hospital, teniendo en cuenta la influencia ejercida por otros nutrientes.

También se ha estimado la biodisponibilidad *in vitro* de Mn, Cr, Al, Ni en comidas rápidas y alimentos de conveniencia (López y col., 2002; Cabrera-Vique y col., 2009, 2011a, 2011b) y en dietas duplicadas del sureste de España (Cabrera-Vique y col., 2013b). Bergillos-Meca y col. (2013) determinaron la biodisponibilidad *in vitro* de Ca, Mg, P y Zn en leches fermentadas, estudiando el efecto que puede tener sobre ella el origen de la leche y la adición de microorganismos probióticos.

Aunque estos métodos sólo estiman la fracción soluble/dializable del elemento disponible para la absorción y, por tanto, sólo el primer paso del proceso, diferentes investigadores han concluido que los resultados obtenidos podrían proporcionar una estimación de la biodisponibilidad *in vivo*. Los resultados de estos modelos deben tomarse como índices relativos de la biodisponibilidad y proporcionan datos que permiten establecer tendencias y comparaciones, y determinar la influencia de diferentes factores (Azenha y col., 2000; Velasco-Reynold y col., 2010).

#### • **Métodos *in vitro* con cultivos celulares**

Estas técnicas utilizan cultivos celulares que se diferencian en monocapas de enterocitos con microvellosidades y actúan de forma similar a las células del epitelio intestinal, ofreciendo unas condiciones fisiológicas donde los mecanismos de absorción a nivel celular pueden ser estudiados (Laitinen, 2006; Perales y col., 2006). También son adecuados como métodos de “screening”, ya que requieren

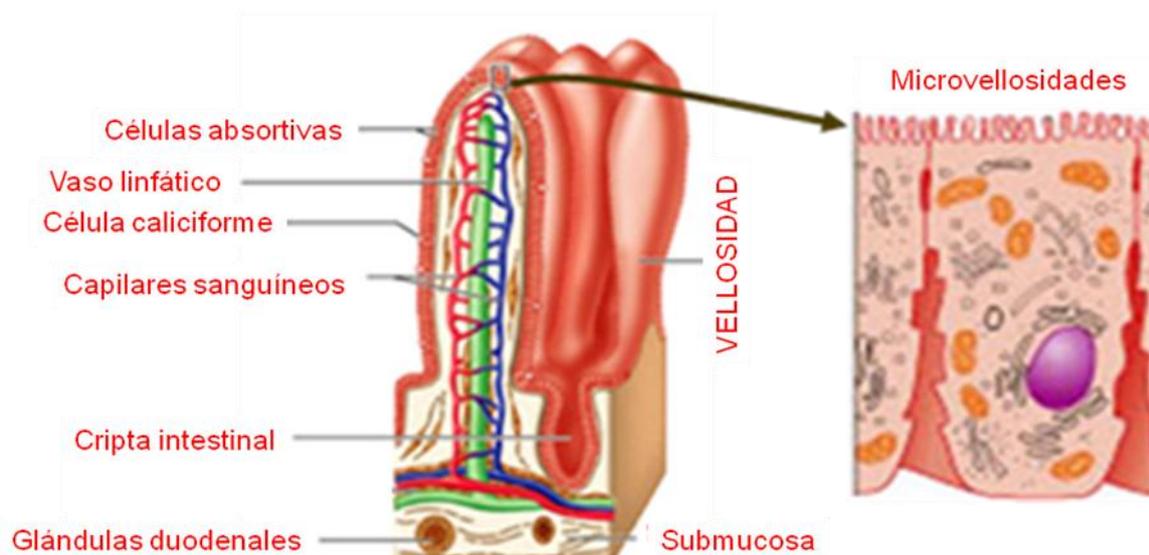
poca cantidad de muestra y son menos laboriosos que los experimentos con animales.

Se utilizan diferentes líneas celulares; la “Madin Darby canine kidney” (MDCK) es una de las más comunes para estudiar la regulación del crecimiento y metabolismo celular. Las células “Chinese hamster ovary” (CHO) se usan desde hace décadas en estudios de transporte de fármacos y sirven principalmente para caracterizar transportadores de membrana como el transportador de péptidos hPepT1. La línea celular de intestino de rata 2/4/A1 se utiliza en estudios de transporte de fármacos, pero la regulación de la expresión génica en roedores es probablemente diferente a la humana. Las células HT29, procedentes de carcinoma de colon, expresan una diferenciación enterocítica y han sido usadas en estudios de absorción solas o en combinación con células Caco-2 (Laitinen, 2006; Laparra y col., 2009).

Para estudios de absorción intestinal de nutrientes, la línea celular Caco-2 es una de las más utilizadas (Viadel y col., 2006; Perales y col., 2007; Seiquer y col., 2010; Algahtani y col., 2013). Se obtuvo a partir de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado obtenido de un paciente de 72 años de edad (Fogh y col., 1977), alcanza confluencia en 3-6 días, llega a la fase de crecimiento estacionario tras 10 días de cultivo y la diferenciación se completa en 20 días (Braun y col., 2000).

Esta línea celular ha sido usada como modelo de permeabilidad intestinal para muchas sustancias, pues se diferencia espontáneamente en células polarizadas, con borde en cepillo y microvellosidades, mostrando muchas de las propiedades fisiológicas y funcionales del enterocito maduro (figura 16). Cuando se cultivan en membranas semipermeables, forman una monocapa celular continua con uniones estrechas, simulando la barrera intestinal (Turco y col., 2011). Además, poseen propiedades de permeabilidad y resistencia similares a las células del colon humano, y expresan muchas enzimas y transportadores presentes en el intestino delgado (Laitinen, 2006).

La literatura reciente indica la existencia de una fuerte correlación entre los resultados obtenidos con la línea celular Caco-2 y los estudios de absorción en humanos, lo que apoya el uso de este modelo para mejorar la evaluación de la biodisponibilidad mineral que se realizaba tradicionalmente sólo con métodos de digestión *in vitro*. El sistema resultante permite simular y estimar la captación y transporte de los elementos minerales.



**Figura 16.** Estructura del intestino humano y del enterocito maduro.

Esta combinación se está empleando cada vez más para estimar la biodisponibilidad de minerales en alimentos y dietas (Laitinen, 2006; Vitali y col., 2010; Tako y col., 2013). Por ejemplo, el efecto de los productos de la reacción de Maillard sobre la biodisponibilidad de Ca y Mg ha sido estudiado por Delgado-Andrade y col. (2005), Mesías (2007) y Mesías y col. (2009). Cilla y col. (2008) estimaron la biodisponibilidad de Fe en bebidas de frutas. La retención y transporte a través de células Caco-2 de Ca, Fe y Zn en legumbres, y el efecto de la cocción, fueron estudiadas por Viadel y col. (2006).

La influencia del tratamiento térmico tanto de la caseína como de la leche sobre la biodisponibilidad mineral también ha sido investigada (Seiquer y col. 2000, 2010). En 2009, Frontela y col. estudiaron el efecto de la desfitinización sobre la biodisponibilidad de Fe, Ca y Zn en cereales infantiles. Vitali y col. (2010) compararon la biodisponibilidad de Cu en diferentes tipos de galletas utilizando cultivos celulares. Calatayud y col. (2012) investigaron la bioaccesibilidad y retención por células Caco-2 de mercurio y Se en pescados y mariscos. Delgado-Andrade y col. (2008) investigaron con cultivos celulares si la sedimentación podía afectar al valor nutritivo de una dieta para lechones, estimando la biodisponibilidad de Ca, Mg y Zn. Más tarde, dichos autores determinaron la biodisponibilidad de hidroximetilfurfural en cereales de desayuno mediante estudios con células Caco-2.

También se ha combinado la línea celular Caco-2 con la HT29-MTX para estudiar las diferentes respuestas de los transportadores de Fe (Laparra y col., 2009).

Fairweather-Tait y col. (2007) presentaron una actualización sobre los métodos *in vitro* utilizados para determinar la biodisponibilidad de Fe, considerando que los métodos de solubilidad y dializabilidad no son útiles para la predicción de la absorción de Fe, mientras que los modelos con células Caco-2 proporcionan resultados útiles para la comparación de la biodisponibilidad de Fe en diferentes fuentes.

La línea celular Caco-2 tiene algunas desventajas como la falta de células caliciformes productoras de mucus o que es una línea heterogénea y dependiente de las condiciones de cultivo, llevando a veces a variabilidad en la permeabilidad y transporte (Turco y col., 2011). Aún así, diferentes investigadores han considerado el paso a través de la monocapa de células Caco-2 como una estimación del perfil de absorción del compuesto ensayado (Zhang y col., 2007; Turco y col., 2011).

Distintos autores han demostrado que existe variabilidad en algunas propiedades de esta línea celular, como la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y el crecimiento celular, que depende del número de pases del cultivo, pues la resiembra de las células afecta a las características biológicas y a las propiedades de permeabilidad de la monocapa celular. Se ha concluido que las células Caco-2 adquieren las características morfológicas y fisiológicas del enterocito maduro tras un gran número de resiembras, y que a mayor número de pases, mayor expresión de los transportadores de glucosa y mejor resistencia, pero a números muy altos ésta última empieza a disminuir. Se considera que los números de pase óptimos para los ensayos de absorción oscilan entre 44 y 60 (Briske-Anderson 1997; Yu y col., 1997; Volpe y col., 2008).

Además del número de pases, existen diversos factores que pueden influir sobre las propiedades de diferenciación y transporte de las células, entre ellos destacan la densidad de siembra inicial, edad de la monocapa, pH de las soluciones adicionadas, medio de cultivo utilizado, características del filtro sobre el que se siembran, etc. Es de extrema importancia que el laboratorio en cuestión monitorice las características del cultivo tanto en las fases de crecimiento y diferenciación como en los análisis, estableciendo un protocolo estándar para disminuir la variabilidad y asegurar la validez de los resultados de permeabilidad. El uso de normas de referencia para monitorizar el crecimiento, integridad y permeabilidad de la monocapa, permite el establecimiento de un criterio de aceptación del ensayo (Ungell y col., 2004; Sambuy y col., 2005).

Aunque la línea celular Caco-2 ha sido ampliamente utilizada, los estudios que evalúan la biodisponibilidad mineral en leche fermentada empleando este modelo son escasos y se refieren a leche de vaca. No existen datos de biodisponibilidad mineral en leche de cabra fermentada.

## 2. OBJETIVOS





De todo lo expuesto se deduce que:

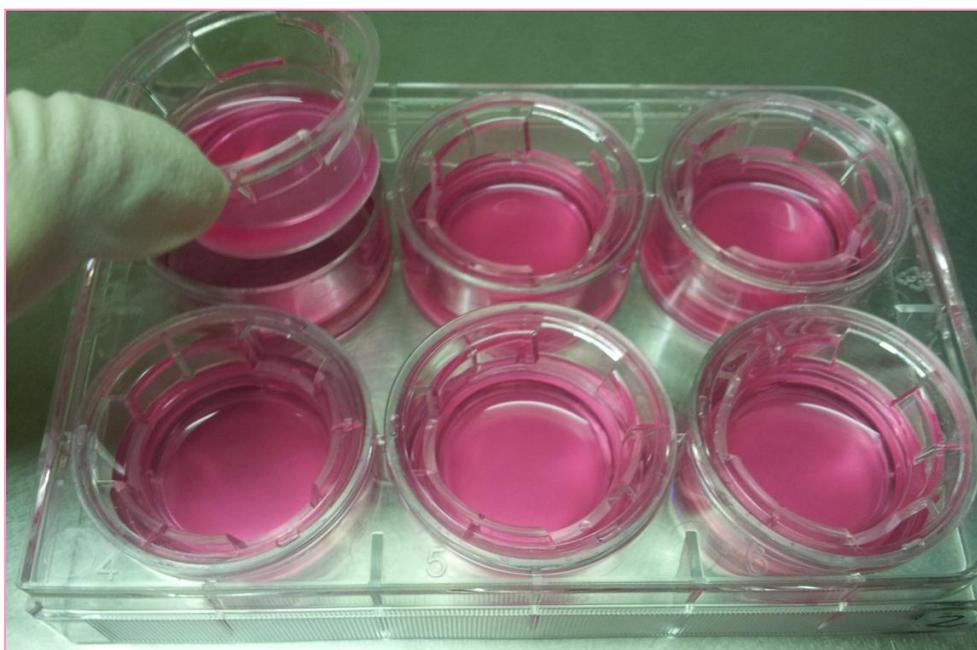
- Para estimar la eficacia del aporte de un mineral a través de la dieta o de un alimento en particular, es preciso conocer no sólo su contenido sino también su biodisponibilidad.
- Diversos estudios indican que la biodisponibilidad de ciertos minerales es superior en leche de cabra que en leche de vaca, siendo escasos los datos relativos a leches de cabra fermentadas. Además, investigaciones recientes señalan que ciertos microorganismos probióticos podrían aumentar la biodisponibilidad de minerales.
- Los modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* y con cultivos celulares son ampliamente utilizados.

Por tanto, nos planteamos los siguientes objetivos:

- ✓ Determinar el contenido de Ca, Mg, P y Zn en la leche fermentada experimental, efectuando un estudio comparativo con otras leches de cabra fermentadas (control y comerciales).
- ✓ Estudiar la biodisponibilidad de estos minerales mediante métodos *in vitro* de solubilidad, dializabilidad y ensayos con la línea celular Caco-2.
- ✓ Evaluar el efecto que ejerce *L. plantarum* C4 sobre la biodisponibilidad mineral.



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS





### 3.1. Instrumentación

#### • Ensayos *in vitro*

Agitador J. P. Selecta S. A. (Barcelona, España).

Balanza de precisión, Series 260, Precisa Instruments AG (Dietikon, Suiza).

Baño de agua termostatzado con agitación, Thermolab® GFL 1086 (BurgWedel, Alemania).

Bloque de digestión multiplazas termostatzado, Selecta S. A. (Barcelona, España).

Centrífuga termostatzada Sigma 2-16PK, Sartorius (Alemania).

Cierres para membranas de diálisis, Spectra Medicell Intenational (London, Reino Unido).

Cubetas de cuarzo, Hellma (Barcelona, España).

Espectrofotómetro UV/VIS, Lambda 25, Perkin Elmer (Boston, MA, Estados Unidos).

Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES), Perkin-Elmer Optima 8300 (Massachusetts, Estados Unidos).

Membranas de diálisis Spectra (Visking size 45mm x 27mm, 12000-14000 Da, Medicell International (London, Reino Unido).

Sonda de pH y temperatura, Crison pH-Meter Basic 20, Crison Instruments, S.A. (Barcelona, España).

Vortex, Cleaver Scientific Ltd (Rugby, Reino Unido).

#### • Ensayos con la línea celular Caco-2

Autoclave Autester Mod. 437-G. JP Selecta (Barcelona, España).

Bomba de vacío, KNF LAB Laboport (New Jersey, Estados Unidos).

Campana de flujo laminar, Modelo SBH – 100, Telstar S.A (Barcelona, España).

Centrífuga H-103N Series, Kokusan, Eurocomercial S.A. (Madrid, España).

Filtros de esterilización de 0,22  $\mu\text{m}$ , Millex® - GS, Merck Millipore Ltd. (Cork, Irlanda)

Frascos de cultivo tisular de 75  $\text{cm}^2$ , TPP® (Suiza).

Incubador (37°C, atmósfera 95:5 aire/CO<sub>2</sub>, 90% humedad), INCOmed, Memmert (Schwabach, Alemania).

Lector de placas, Thermo Scientific Multiskan EX, Labsystems (Vantaa, Finlandia).

Micropipetas de 0,5-10 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL, Boeco (Alemania).

Micropolímetro Millicell® ERS - 2, Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos).

Microscopio óptico invertido, Casa Álvarez S.A. (Madrid, España).

Osmómetro OSMOMAT 030, Gonotec GmbH (Berlín, Alemania).

Pipeta multicanal 50-300 µL, Finnpipette, Labsystems (Vantaa, Finlandia).

Pipetas estériles de 2 mL, 5 mL y 10 mL.

Pipetas Pasteur de cristal.

Pipeteador electrónico, Easy 60+, Labbox Labware S.L. (Barcelona, España).

Placas bicamerales Transwell®, membrana de policarbonato, tamaño de poro = 3,0 µm, diámetro = 24 mm, n3414, Corning Costar (Cambridge, MA, Estados Unidos).

Placas estériles de 96 pocillos, 3598, Corning Costar (Cambridge, MA, Estados Unidos).

Tubos estériles de 10 mL y 50 mL, TPP® (Suiza).

- Para evitar la presencia de minerales, todo el material utilizado en el laboratorio fue lavado con ácido nítrico al 30% v/v y enjuagado repetidas veces con agua bidestilada desionizada.

### 3.2. Reactivos y disoluciones

#### • Ensayos *in vitro*

Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Ácido perclórico 65%, Merck (Darmstadt, Alemania).

Agua bidestilada desionizada, sistema Milli-Q de Millipore, resistividad específica = 18 MΩ·cm. Modelo R015 (Millipore, Gif Sur Yvette, Francia).

Bicarbonato sódico 99,5%, Sigma S-6297, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Estados Unidos), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Dodecil sulfato sódico, Merck (Darmstadt, Alemania).

Etanol, Merck (Darmstadt, Alemania).

Hidróxido sódico, Panreac Química Sau (Barcelona, España).

Pancreatina, porcine pancreas, P-1500, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Estados Unidos), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Pepsina 1:10000, porcine stomach mucosa, P-7000, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Estados Unidos), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Sales biliares, B-8631, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Estados Unidos), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Solución de calibración multipatrón, Multielement Calibration Standard 3, Perkin Elmer (Massachusetts, Estados Unidos).

#### • Ensayos con la línea celular Caco-2

4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), H4034, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), M5655, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Colorante azul de metileno, 251170.1609, Panreac Química Sau (Barcelona, España)

Colorante azul tripán, T8154, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Colorante rojo neutro, N4638, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Hank's balanced salt solution (HBSS), H2387, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

L-glutamina, G8540, Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Estados Unidos).

Medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), D6546, Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Estados Unidos).

Phosphate Buffered Saline (PBS), P4417, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Solución antibiótico-antimicótico, A5955, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Solución de aminoácidos no esenciales, M7145, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Solución tripsina-EDTA 0,25%, T3924, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Suero bovino fetal, F7524, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

#### Disoluciones:

- Buffer de captación. La composición de este buffer fue 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM glucosa, 50 mM HEPES. Siempre se ajustó el pH a 7.
- Disolución de amidol. Se disolvieron 1 g de amidol (2,4-diaminofenol diclorhidrato) y 20 g de metabisulfito sódico en 100 mL de agua bidestilada desionizada.
- Disolución de molibdato amónico. Se disolvieron 8,3 g de molibdato amónico en 100 mL de agua bidestilada desionizada.
- Isopropanol ácido. Se preparó HCl 0,04 N en isopropanol, mezclando 0,42 mL de HCl al 35% con 100 mL de isopropanol.
- Solución acético glacial/etanol. Ésta se preparó añadiendo un 1% de ácido acético glacial a una disolución de etanol en agua bidestilada desionizada al 50%.
- Solución de ajuste. Esta disolución contenía 5 mM glucosa, 50 mM HEPES y NaCl 130 mM. Siempre se ajustó el pH a 7.
- Solución de fijación. La composición de esta disolución fue CaCl<sub>2</sub> al 0,1% en formaldehído al 0,5%.
- Solución de lavado. Compuesta por 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES. Siempre se ajustó el pH a 7.
- Solución de MTT. Para su preparación se disolvieron 0,05 g MTT en 10 mL de PBS.

- Solución de pancreatina-sales biliares. Al inicio de cada ensayo, se preparó una disolución equivalente a 0,005 g/100 mL de pancreatina y 0,03 g/100 mL de sales biliares en  $\text{NaHCO}_3$  0,1N.
- Solución de pepsina. Al inicio de cada ensayo, se preparó una disolución equivalente a 0,02 g/100 mL en HCl 0,1 N.
- Solución de rojo neutro. Se preparó una solución madre de rojo neutro al 0,4% w/v en agua bidestilada desionizada. Para su utilización en los ensayos, se preparó una solución de tinción diluyendo la solución madre 1:80 en medio de cultivo DMEM.

### 3.3. Muestras

El muestreo comprendió 10 leches fermentadas experimentales (con *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *L. plantarum* C4), 10 leches fermentadas control (con *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) y las 5 leches de cabra fermentadas existentes en el mercado en el momento del estudio.

Antes de realizar los análisis, todas las muestras se llevaron a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  y se homogeneizaron cuidadosamente. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

### 3.4. Ensayo de biodisponibilidad *in vitro*: fracción soluble

El ensayo comprende dos etapas: etapa gástrica y etapa intestinal.

#### • Etapa gástrica

Para llevar a cabo la etapa gástrica se siguió el procedimiento descrito por Perales y col. (2007), con algunas modificaciones.

Antes de tomar la muestra, se homogeneizó la leche fermentada con ayuda de un ultrasonidos. En un matraz de 250 mL de capacidad, se pesaron 20 g de leche fermentada y se añadieron 80 g de agua bidestilada desionizada. Esta mezcla se agitó en el ultrasonidos hasta completa homogeneización y se determinó el pH, ajustándolo a pH 2 con HCl 6 M. Al cabo de 15 minutos se volvió a comprobar el pH, reajustándolo en caso necesario.

Posteriormente, se añadió a la mezcla una solución de pepsina equivalente a 0,02 g/100 mL y se completó hasta 100 mL con agua bidestilada desionizada, tapando el

matraz. La mezcla se incubó en un baño de agua a 37°C con una agitación de 100-120 golpes/minuto, durante 2 horas.

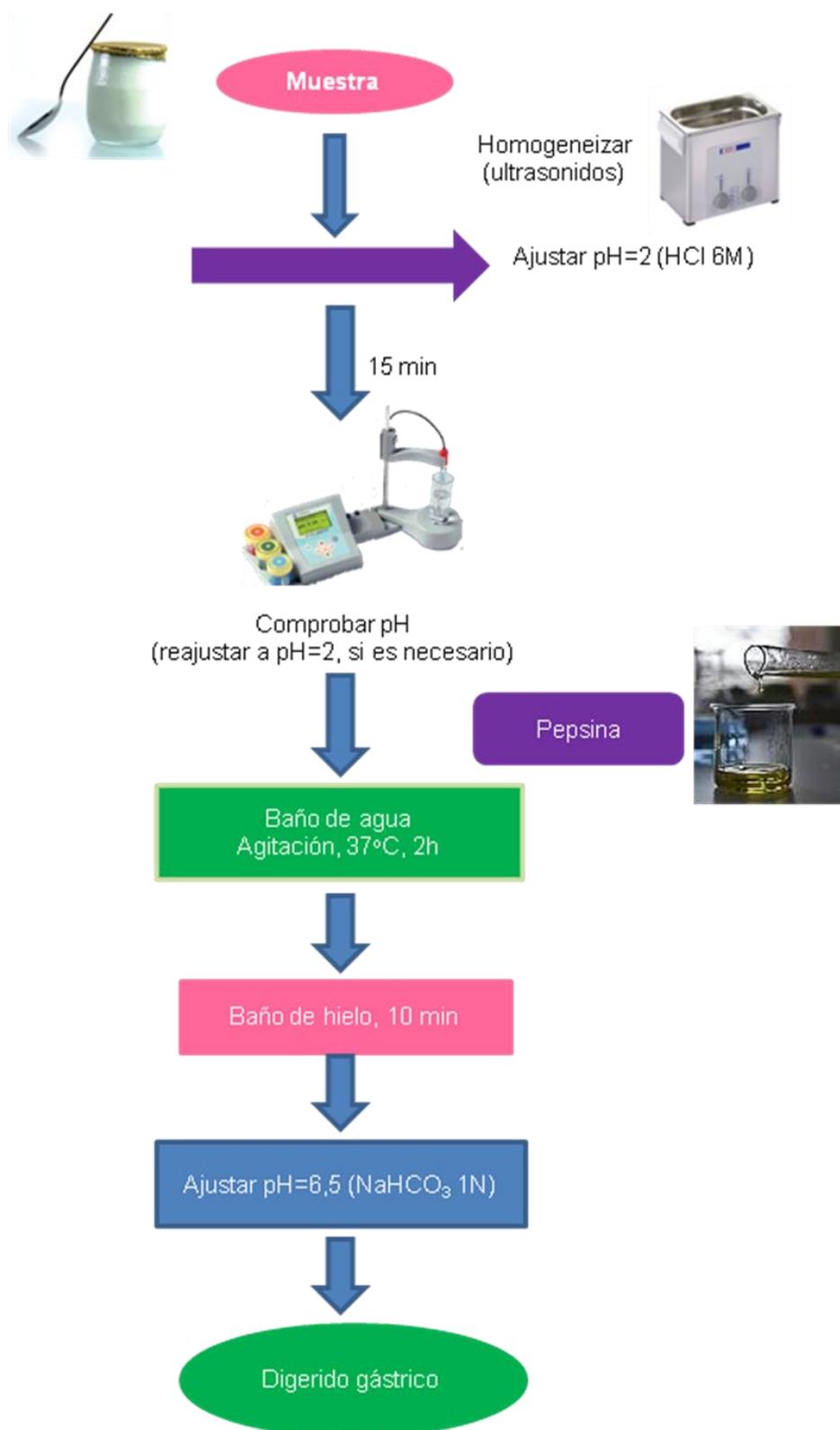
Transcurrido este tiempo, el matraz se sumergió en un baño de hielo durante 10 minutos. Por último, se ajustó el pH a 6,5 con NaHCO<sub>3</sub> 1N, reajustando en caso necesario tras 15 minutos en reposo. En la figura 17 se esquematiza esta etapa.

• **Etapa intestinal**

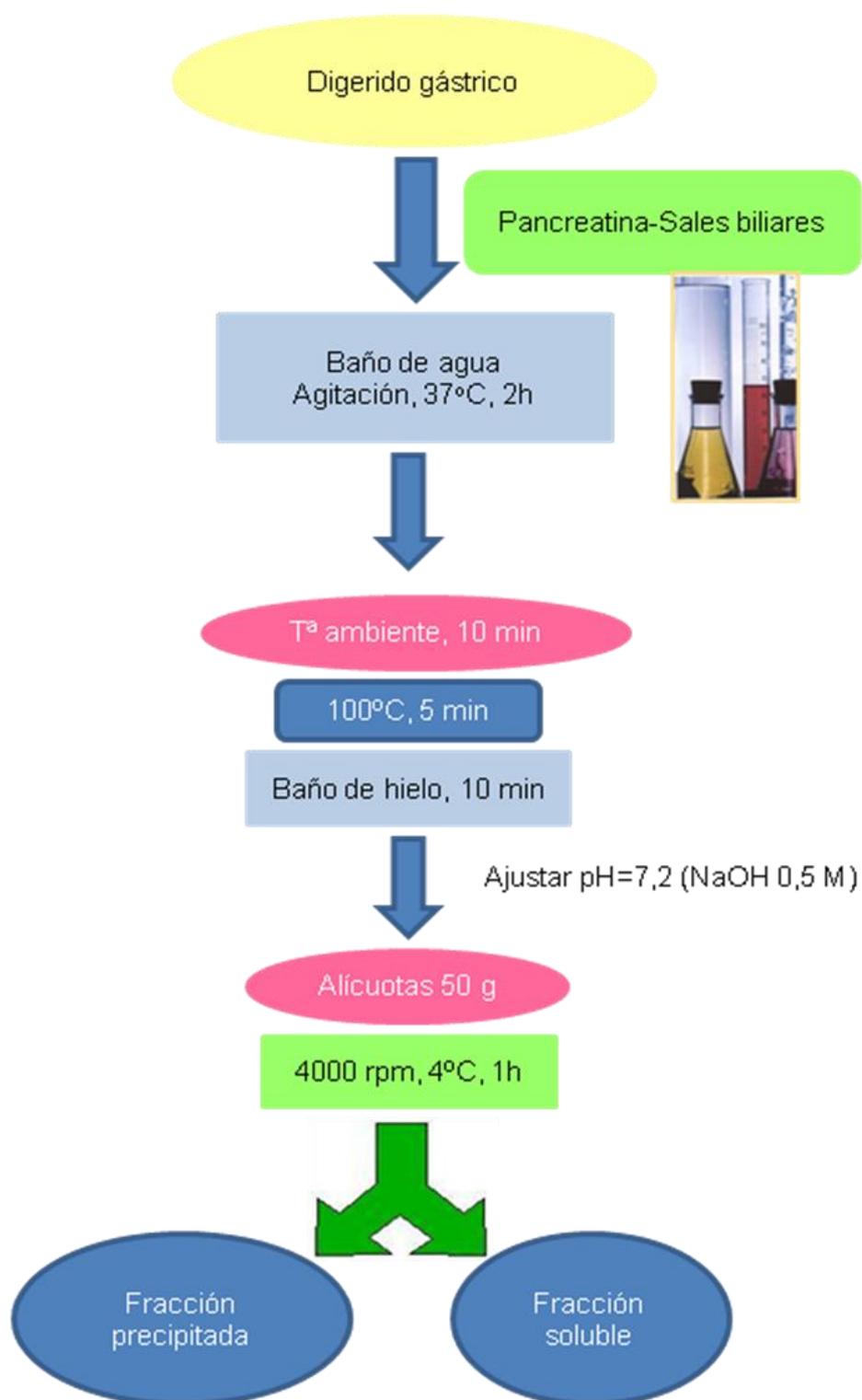
Tras finalizar la etapa gástrica, se añadió a los digeridos una solución de pancreatina-sales biliares equivalente a 0,005 g/100 mL de pancreatina y 0,03 g/100 mL de sales biliares y se incubaron en el baño a 37°C con agitación de 100-120 golpes/minuto, durante 2 horas.

Los digeridos se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente y se llevaron a un baño de agua a 100°C durante 5 minutos para conseguir la inactivación enzimática. Seguidamente, se sumergieron en un baño de hielo durante 10 minutos y el pH fue ajustado a un valor de 7,2 mediante la adición de NaOH 0,5 M, reajustando en caso necesario tras 15 minutos de reposo.

Se pesaron alícuotas de 50 g de digerido intestinal y se centrifugaron a 4000 rpm a 4°C durante 1 hora para separar la fracción soluble o bioaccesible y el precipitado. Ambas fracciones se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del análisis. El procedimiento seguido en esta etapa se resume en la figura 18.



**Figura 17.** Etapa gástrica en el ensayo de biodisponibilidad *in vitro* para estimar la fracción soluble.



**Figura 18.** Etapa intestinal en el ensayo de biodisponibilidad *in vitro* para estimar la fracción soluble.

### 3.5. Ensayo de biodisponibilidad *in vitro*: fracción dializable

#### • Acondicionamiento de membranas

Como se ha comentado anteriormente, para este ensayo se utilizan membranas de diálisis que simulan la membrana intestinal. Antes de su utilización, resulta necesario acondicionarlas. Para ello, se cortaron fragmentos de 13,3 cm y se sumergieron en una disolución compuesta por  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,01 M,  $\text{NaHCO}_3$  al 2% y dodecil sulfato sódico al 0,1%, llevando todo a ebullición durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron 5 veces con agua bidestilada desionizada y se llevaron a ebullición una vez más con dicha agua durante un periodo de 5-10 minutos.

Una vez tratadas, las membranas de diálisis se mantuvieron a 4°C en una disolución de etanol al 20%, que actúa como agente antibacteriano, hasta el momento de su utilización. Antes de comenzar los ensayos, se lavaron de nuevo interna y externamente, 5 ó 6 veces con agua bidestilada desionizada y se mantuvieron en dicha agua durante al menos 2 horas.

#### • Etapa gástrica

Se procedió como se describe en el apartado 3.4. y al finalizar el proceso, las muestras se mantuvieron en baño de hielo durante 90 minutos, tiempo en el que se calculó el título de acidez (figura 19).

#### • Título de acidez

El título de acidez se define como “el número de equivalentes de  $\text{NaOH}$  0,5 M necesarios para llevar a pH 7,5 alícuotas de 20 g del digerido de pepsina, previa adición de la disolución de pancreatina-sales biliares”. Para calcularlo, se pesó una alícuota de 20 g del digerido de pepsina procedente de la etapa gástrica a una temperatura de 20°C y se le adicionó una solución de pancreatina-sales biliares equivalente a 0,001 g de pancreatina y 0,006 g de sales biliares. La mezcla se valoró con  $\text{NaOH}$  0,5 M manteniendo agitación hasta que se alcanzó un pH de 7,5, reajustándolo tras 30 minutos de reposo.

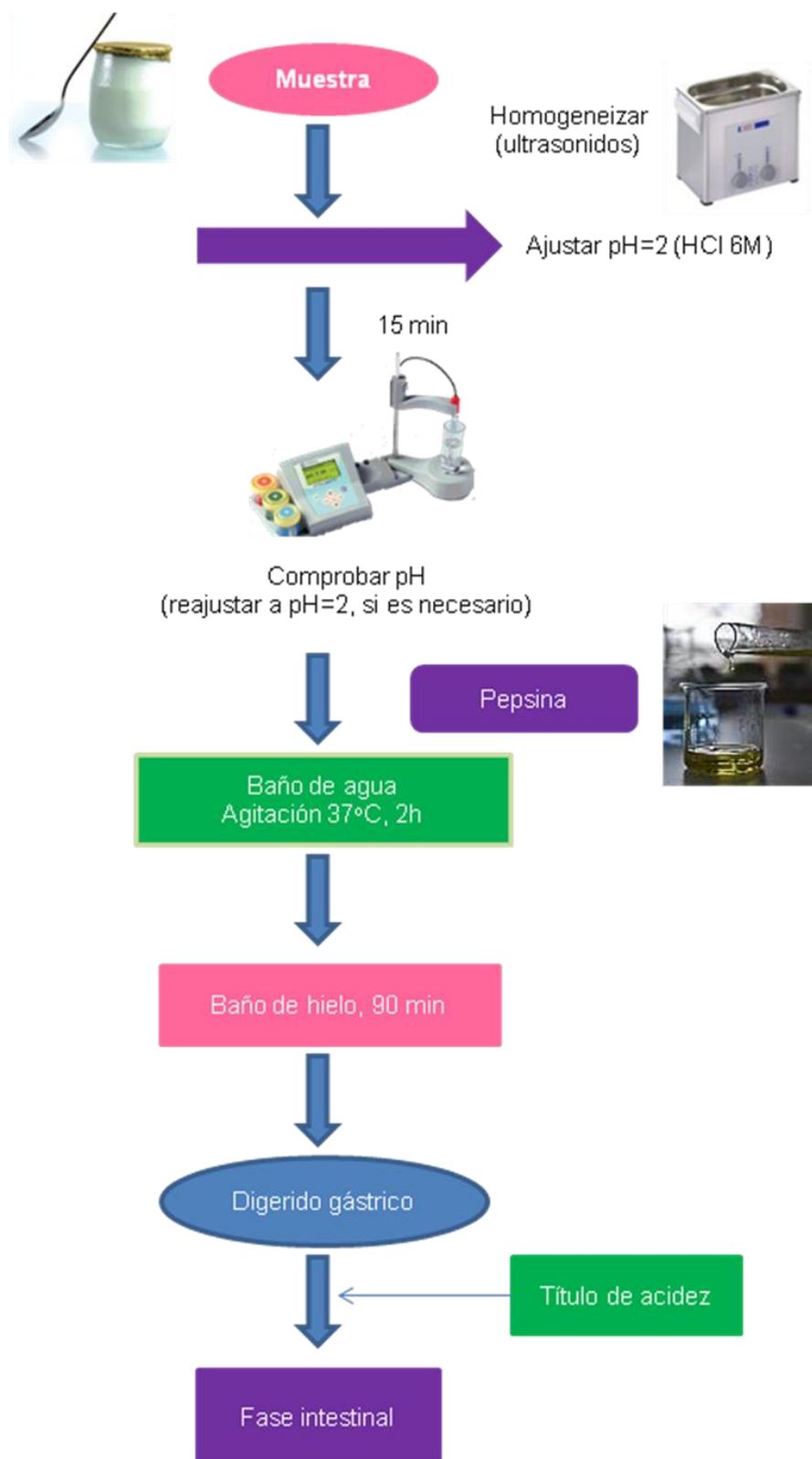
Se calculó la cantidad de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M equivalente al  $\text{NaOH}$  0,5 M consumido. Esta cantidad deberá adicionarse en el interior de las membranas de diálisis para la etapa intestinal (figura 20).

• **Etapa intestinal**

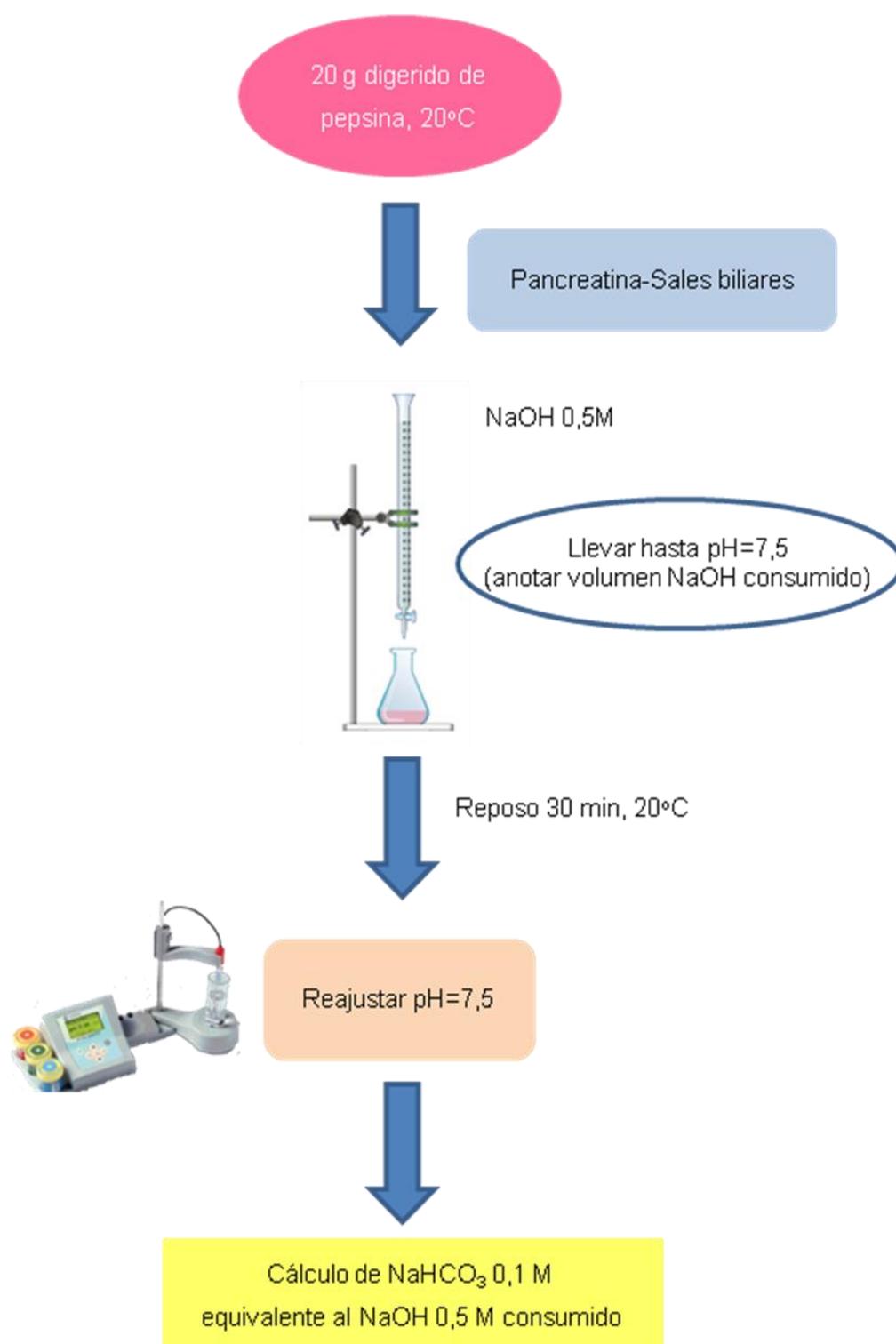
Se prepararon las membranas de diálisis introduciendo 25 g de agua bidestilada desionizada y  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M en cantidad equivalente al título de acidez, cerrándolas después con pinzas adecuadas. Se pesaron alícuotas de 20 g del digerido de pepsina, obtenido en la etapa gástrica, en vasos de precipitado de 250 mL y se colocaron en el baño de agua a 37°C durante 5 minutos.

Se introdujeron las membranas de diálisis en los vasos de precipitado y se incubaron en el baño 30 minutos. Se midió y anotó el pH, y se ajustó a 5 cuando fue necesario. A continuación, se añadió una solución de pancreatina-sales biliares equivalente a 0,001 g de pancreatina y 0,006 g de sales biliares, incubando la mezcla en el baño de agua a 37°C con agitación de 100-120 golpes/minuto durante 2 horas.

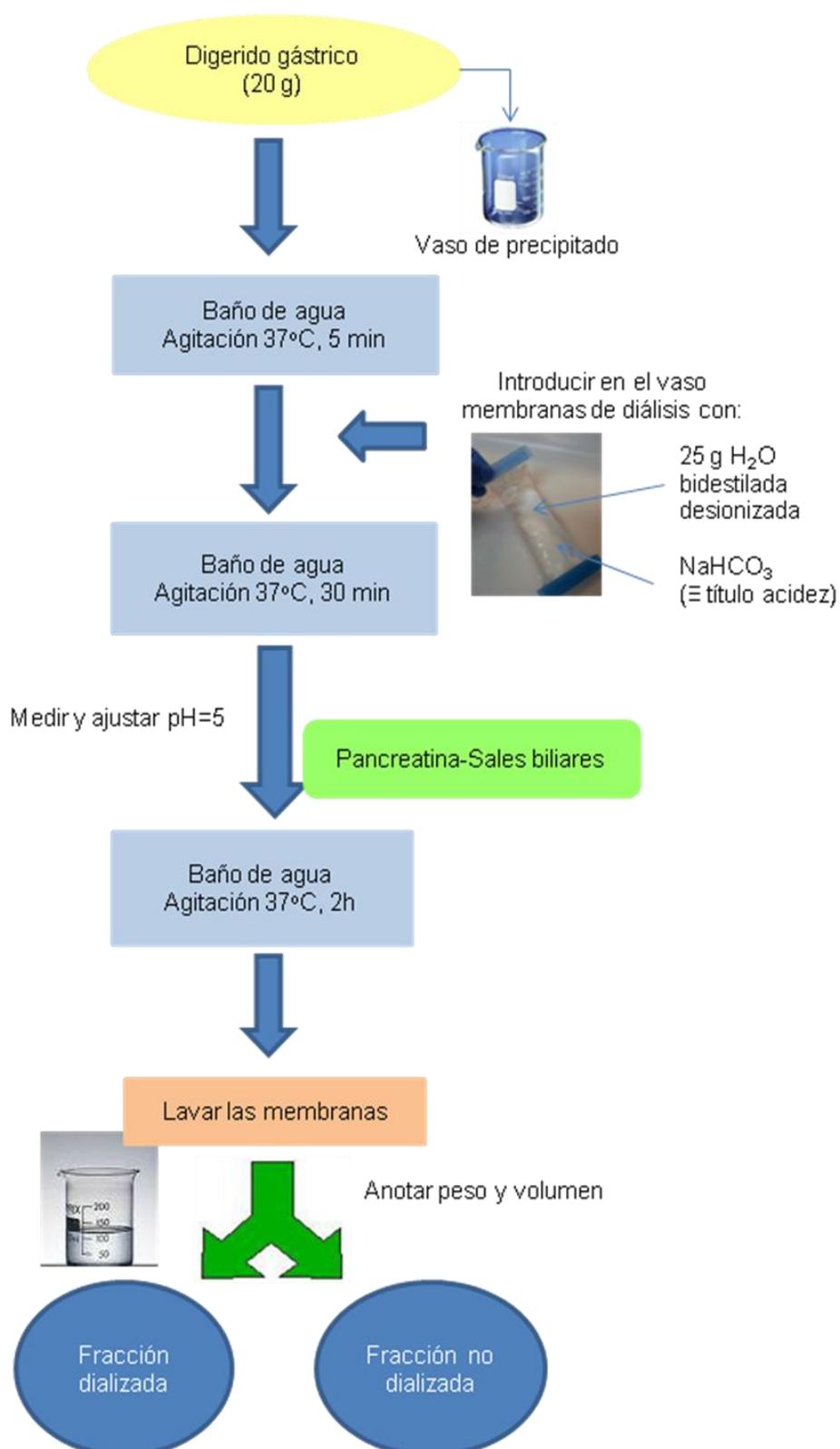
Se sacaron las membranas de diálisis y se enjuagaron externamente con agua bidestilada desionizada. Por último, se transfirió su contenido a vasos de precipitado, anotando su peso y volumen. El contenido de analito que difunde al interior de la membrana representa la fracción dializada. Las fracciones dializada y no dializada se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del análisis (figura 21).



**Figura 19.** Etapa gástrica en el ensayo de biodisponibilidad *in vitro* para estimar la fracción dializable.



**Figura 20.** Determinación del título de acidez en el ensayo de biodisponibilidad *in vitro* para estimar la fracción dializable.



**Figura 21.** Etapa intestinal en el ensayo de biodisponibilidad *in vitro* para estimar la fracción dializable.

### 3.6. Ensayo de biodisponibilidad *in vitro*: fracción transportada y captada

Este ensayo se llevó a cabo con la línea celular Caco-2 en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y en el “Department of Food and Nutritional Sciences” de la Universidad de Reading (Reino Unido). Estos laboratorios constan de la instrumentación y material necesarios para la correcta manipulación de cultivos celulares. Siempre se trabajó en ambiente estéril y en campana de flujo laminar.

Las células Caco-2 fueron suministradas por la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y a través de la Universidad de Reading.

El ensayo se realizó con los sobrenadantes obtenidos tras la digestión *in vitro* (descrita en el apartado 3.4.) a fin de valorar el transporte y captación de Ca, Mg y Zn.

Previamente es necesario comprobar que el ensayo es factible y que los sobrenadantes no van a dañar el cultivo celular. Se procedió a la siembra y evaluación de la morfología celular y se efectuaron diversas pruebas para comprobar su viabilidad y actividad metabólica, ensayos que se describen a continuación.

Una vez realizadas estas comprobaciones, se sembró el cultivo celular en placas bicamerales para efectuar el ensayo de transporte y captación con los sobrenadantes.

#### • Mantenimiento en cultivo de la línea celular

Para su mantenimiento, crecimiento y proliferación, las células se sembraron en frascos de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> de superficie, conteniendo medio de cultivo DMEM suplementado con:

-L-glutamina . . . . .	0,584 g/L
-Suero bovino fetal inactivado . . . . .	10%
-Aminoácidos no esenciales . . . . .	1%
-Mezcla antibiótico-antimicótico . . . . .	1%
-HEPES . . . . .	.5 mmol/L

Las células fueron mantenidas a 37°C, en atmósfera 95:5 aire/CO<sub>2</sub> y con una humedad del 90%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días, hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada del 70%.

En ese momento se procedió a la tripsinización, proceso mediante el que se despegan y separan las células de los frascos, y a la realización de una suspensión celular, para la siembra de las células en frascos nuevos.

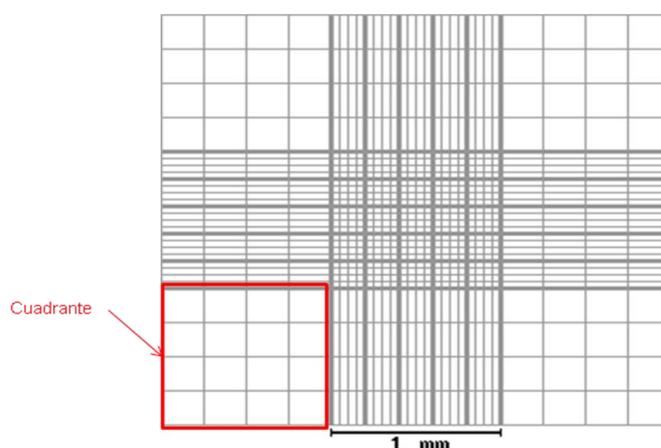
Para ello, se desechó el medio de cultivo, se lavaron las células con HBSS o PBS, y se incubaron con 10 mL de tripsina-EDTA durante 5 minutos. Cuando la monocapa celular se despegó ligeramente de la superficie del frasco, se adicionó medio de cultivo DMEM para detener la tripsinización, se homogeneizó la suspensión suavemente con ayuda de una pipeta y se traspasó a tubos de centrifuga de 50 mL. Las células fueron centrifugadas a 850 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante, obteniéndose un botón celular que fue resuspendido cuidadosamente en DMEM para obtener una suspensión celular homogénea.

Dicha suspensión se distribuyó en los nuevos frascos para continuar el crecimiento y la proliferación, y expandir así el cultivo celular. Las células fueron sometidas a diferentes siembras o pases, utilizándose entre los pases 50-60.

#### *Recuento celular*

Para conocer el número de células presentes en el cultivo, se utilizó el método de tinción con el colorante azul tripán y recuento en cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Tras la tripsinización y resuspensión en un determinado volumen de DMEM, una alícuota de la suspensión celular fue mezclada con el colorante a distintas diluciones (1/2 y 1/10). La mezcla se homogeneizó cuidadosamente, se depositó en la cámara de Neubauer y se realizó el contaje de células en varios cuadrantes con el microscopio óptico invertido (figura 22).



**Figura 22.** Esquema de un cuadrante en la cámara de Neubauer.

$$\text{Área} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$$

$$\text{Volumen} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

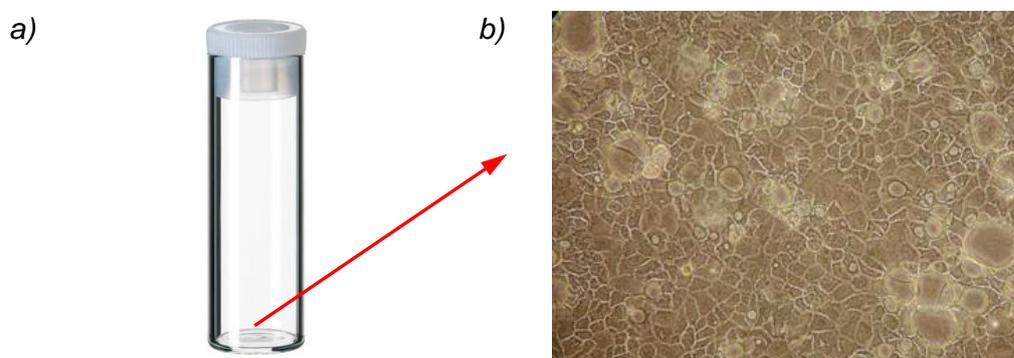
$$\text{Concentración} = n^{\circ} \text{ células} \times 10.000 \times F_{\text{dilución}} = n^{\circ} \text{ células/mL}$$

El área de un cuadrante es  $1 \text{ mm}^2$  y la altura entre la cámara y el cubreobjetos es  $0,1 \text{ mm}$ , de manera que se contó el número de células en un volumen de  $0,1 \text{ mm}^3$ . Para determinar la densidad celular ( $n^{\circ}$  células/mL) se contaron las células en varios cuadrantes y se calculó el contenido medio de células por cuadrante, éste se multiplicó por 10.000 y por el factor de dilución (2 ó 10).

Las células no viables son capaces de captar este colorante, mientras que las células vivas no se tiñen, debido a que mantienen la integridad de su membrana. Este método permitió preparar suspensiones celulares a la densidad requerida para cada ensayo y mostró que la viabilidad de las suspensiones celulares utilizadas nunca fue inferior al 85%.

#### *Morfología celular*

La morfología celular se observó una vez transcurridas 24 h y 48 h de la siembra, realizando tinciones en frascos Shell-vial estériles, que contienen un cristal en el fondo sobre el que crecen las células (figura 23.a). Se sembró 1 mL de la suspensión celular en dicho frasco y se llevó a incubar durante 24-48 h; seguidamente se procedió a la tinción con colorante azul de metileno, se sacó el cristal con el cultivo y se colocó sobre un portaobjetos. Con el microscopio óptico invertido, se comprobó el correcto crecimiento y morfología de la monocapa en forma de mosaico, característico de la línea celular Caco-2 (figura 23.b).



**Figura 23.** a) Frasco Shell-vial. b) Morfología de la línea celular Caco-2.

### • Ensayos de viabilidad celular

Estos ensayos se realizaron aplicando los métodos de tinción con rojo neutro y azul tripán al cultivo tras ser incubado con los sobrenadantes sin diluir y diluidos en proporciones 1/2, 1/3 y 1/5 con solución de ajuste. Esta solución se prepara con glucosa, HEPES y NaCl, tal como se describe en el apartado 3.2.

Además, se ensayaron los sobrenadantes ajustando, antes de efectuar dichas diluciones, su osmolaridad a 310 mOsm/kg (con agua o NaCl), su pH a 7 (con NaOH ó HCl) y su concentración de HEPES a 50 mM.

#### *Método de tinción con rojo neutro*

Las células obtenidas tras la tripsinización se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células/mL y se incubaron durante 48 h para permitir la adhesión celular.

Antes de efectuar la tinción, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por los sobrenadantes. Tras 2 h de incubación, se retiraron los mismos, se añadieron 200 µL de solución de rojo neutro en cada pocillo y se llevaron a incubación otras 2 h.

Transcurrido este tiempo, se desechó el colorante invirtiendo la placa, se sumergió ésta en solución de fijación y se hicieron 30 oscilaciones suaves. Tras ello se sumergió la placa en PBS y se hicieron 2 inversiones, desechando el medio cada vez. Se secó la placa sobre un papel de filtro y se añadieron 200 µL de solución acético glacial/etanol para lisar las células.

La placa se almacenó a 4°C durante 12-24 h, período en el que las células que eran viables, liberan el colorante retenido.

Para determinar la viabilidad, se puso la placa en agitación suave unos 30 min y se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas. La absorción será proporcional a la cantidad de colorante liberado y por tanto, al número de células viables.

El porcentaje de viabilidad se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Siendo,

$\text{Abs}_{\text{muestra}}$  = absorbancia obtenida para cada muestra

$\text{Abs}_{\text{control}}$  = absorbancia obtenida en pocillos a los que en lugar de muestra sólo se les añadió medio de cultivo DMEM sin suero bovino fetal

El ensayo se realizó para cada sobrenadante en 10 pocillos, obteniendo la media, y en dos días diferentes, para valorar la repetibilidad de la prueba.

#### *Método de tinción con azul tripán*

Una vez obtenidos los resultados de viabilidad celular con rojo neutro, éstos se confirmaron mediante el ensayo de tinción con azul tripán. Tras la tripsinización, las células se sembraron en placas Petri de 9,2 cm<sup>2</sup> de superficie a una densidad de 40.000 células/cm<sup>2</sup>, con cambios de medio cada 2-3 días. Transcurridos 10 días, se incubaron las placas durante 2 h con los sobrenadantes. Tras ello, se procedió a una nueva tripsinización y una alícuota de la suspensión celular fue mezclada con colorante azul tripán (dilución 1/2). Se depositó en una cámara de Neubauer y se realizó el contaje de células viables y no viables (éstas captan el colorante) con el microscopio óptico invertido.

El porcentaje de viabilidad se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{N}^{\circ} \text{ células viables} / \text{N}^{\circ} \text{ células totales}) \times 100$$

#### • **Ensayos de actividad metabólica celular**

Estos ensayos se realizaron con el método del MTT en el cultivo tras ser incubado con los sobrenadantes sin diluir y diluidos en proporciones 1/2, 1/3 y 1/5, con solución de ajuste (preparada con glucosa, HEPES y NaCl, tal como se describe en el apartado 3.2.).

Además, se ensayaron los sobrenadantes ajustando, antes de efectuar dichas diluciones, su osmolaridad a 310 mOsm/kg (con agua o NaCl), su pH a 7 (con NaOH ó HCl) y su concentración de HEPES a 50 mM.

El método del MTT es un ensayo colorimétrico cuantitativo que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Este método se basa en la capacidad que presenta la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células eucariotas vivas para convertir el MTT, que es de color amarillo y actúa de sustrato, en formazán, que es un producto azul oscuro, lo cual se traduce en un incremento en los valores de absorbancia de la muestra. Existe una estrecha correlación entre el número de células viables y la cantidad de MTT metabolizado.

Para realizar este ensayo, las células obtenidas tras la tripsinización se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células/mL y se incubaron durante 48 h para permitir la adhesión celular.

Tras este periodo, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por los sobrenadantes. Tras 2 h de incubación, se retiraron las muestras, se añadieron 100 µL de DMEM sin suero y 10 µL de solución de MTT en cada pocillo y se llevaron a incubación otras 2 h.

Se añadieron 100 µL de isopropanol ácido y se procedió de inmediato a la disolución de los cristales azules formados, usando una pipeta multicanal, y protegiendo siempre la placa de la luz.

Para determinar la actividad metabólica, se leyó la absorbancia a 550 nm, con referencia a 650 nm, en un lector de placas. La absorbancia será proporcional a la actividad metabólica celular.

El porcentaje de actividad metabólica se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad metabólica} = (\text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Siendo,

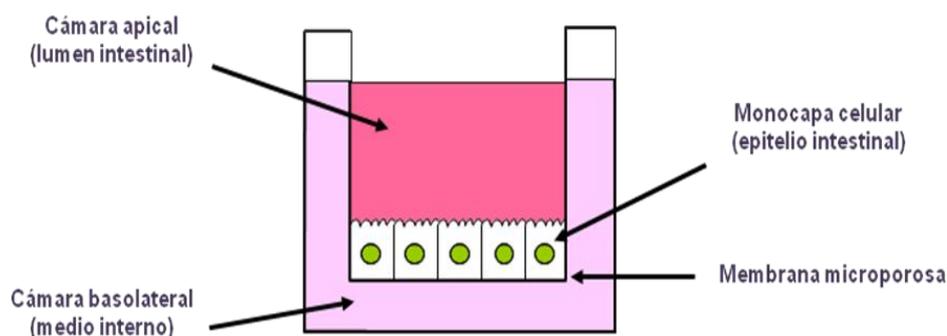
$\text{Abs}_{\text{muestra}}$  = absorbancia obtenida para cada muestra

$\text{Abs}_{\text{control}}$  = absorbancia obtenida en pocillos a los que en lugar de muestra sólo se les añadió medio de cultivo DMEM sin suero

El ensayo se realizó para cada sobrenadante en 10 pocillos, obteniendo la media, y en dos días diferentes, para valorar la repetibilidad de la prueba.

#### • Siembra de las células Caco-2 en placas bicamerales

Para los ensayos de biodisponibilidad, las células obtenidas tras la tripsinización se sembraron en placas bicamerales a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>, con 2,5 mL de DMEM en el compartimento basolateral y 1,5 mL en el apical (figura 24). El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y los experimentos se realizaron tras 21 días desde la siembra. Durante todo este período, es necesario comprobar la integridad y confluencia de la monocapa.



**Figura 24.** Esquema de una placa bicameral (Mesías y Seiquer).

*Integridad y confluencia de la monocapa*

Se comprobó con la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y del transporte del rojo fenol.

-Medida de la resistencia eléctrica transepitelial

Este valor indica la resistencia de la monocapa de células al paso de la corriente eléctrica, y su aumento y estabilidad confirman la formación de una monocapa íntegra con uniones estrechas entre las células. Valores anormalmente bajos supondrían la existencia de orificios o de anomalías en el funcionamiento celular. Se llevó a cabo utilizando un micropolímetro y realizando tres medidas por pocillo. Los valores se determinaron mediante la siguiente ecuación:

$$TEER = (\Omega_{muestra} - \Omega_{blanco}) \times 4,7$$

Siendo,

$\Omega_{muestra}$  = resistencia de la monocapa celular

$\Omega_{blanco}$  = resistencia de un pocillo sin células

4,7 = superficie de un pocillo (cm<sup>2</sup>)

-Transporte de rojo fenol

El paso del colorante a través de una monocapa celular íntegra no debe ser superior al 5% por hora. Las células están sembradas en el medio de cultivo DMEM, que contiene rojo fenol. Para determinar el transporte del mismo se aspiró el medio de cultivo de las placas bicamerales, lavando ambas cámaras con buffer de captación,

libre de rojo fenol. Una vez eliminado todo resto de colorante, se añadieron 2,5 mL de dicho buffer en la cámara basolateral y 1,5 mL de medio de cultivo DMEM en la apical, incubando las células durante 1 hora.

A continuación, se recogió el contenido de la cámara basolateral, se ajustó a pH 10 (donde sólo existe la forma básica del rojo fenol) con NaOH 5 N y se midió su absorbancia a 558 nm.

El porcentaje de difusión del colorante se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Difusión} = (\text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{total}}) \times 100$$

Siendo,

$\text{Abs}_{\text{muestra}}$  = absorbancia de un pocillo con células

$\text{Abs}_{\text{total}}$  = absorbancia de una mezcla de 2,5 mL de buffer de captación y 1,5 mL de DMEM

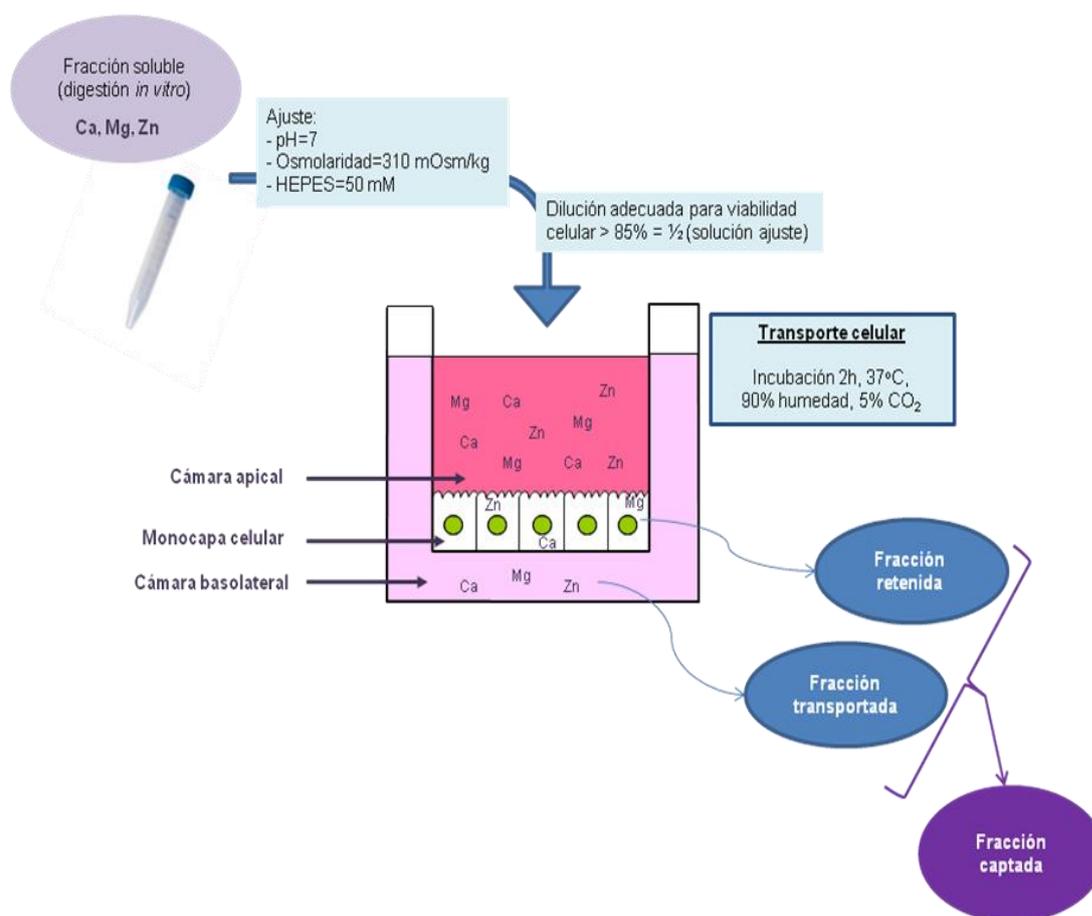
#### • Ensayos de transporte y captación de Ca, Mg y Zn

Los ensayos previos de viabilidad y actividad metabólica celular demostraron que, para no dañar el cultivo celular, los sobrenadantes debían ser ajustados a 310 mOsm/kg, 50 mM HEPES y pH 7 y además, diluidos 1/2 en solución de ajuste.

Antes de comenzar el ensayo, se atemperaron todas las soluciones a 37°C. Se retiró el medio de cultivo de ambos compartimentos de las placas bicamerales, lavando la monocapa de células dos veces consecutivas con PBS. Se adicionaron 2,5 mL de buffer de captación en la cámara basolateral, mientras que en la cámara apical se adicionaron 1,5 mL de los sobrenadantes ajustados y diluidos, incubándose durante 2 horas a 37°C. La figura 25 representa un esquema del procedimiento.

Tras la incubación, se midió el valor de la TEER de cada pocillo para comprobar que las monocapas seguían íntegras. Se recogió el contenido de la cámara apical en un tubo, se lavó la membrana con solución de lavado enfriada con hielo y se unió a lo anterior (fracción no transportada), se recogió el contenido de la cámara basolateral en otro tubo (fracción **transportada**) y se cortó la membrana cuidadosamente con un bisturí para analizarla también (fracción **retenida**). Todas las fracciones se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del análisis de Ca, Mg y Zn. La fracción **captada** se calculó sumando la transportada y la retenida.

En todos los casos, se tuvo en cuenta el blanco correspondiente.



**Figura 25.** Ensayos de transporte y captación de minerales con la línea celular Caco-2.

### 3.7. Determinación de Ca, Mg, P y Zn

La determinación de Ca, Mg y Zn se efectuó por espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES), previa mineralización ácida de las leches fermentadas para conocer su contenido total, de los sobrenadantes para estimar la fracción soluble y de los dializados para conocer la fracción dializable. Además, alícuotas de los sobrenadantes ajustados y diluidos fueron mineralizadas para determinar el contenido de Ca, Mg, P y Zn añadido a las células.

En el caso de los ensayos de biodisponibilidad con la línea celular Caco-2, la determinación se realizó directamente (sin mineralizar la muestra) en la fracción transportada. Sí se procedió a la mineralización ácida de la membrana con la monocapa celular, a fin de determinar la fracción retenida.

La determinación de P se efectuó por espectrofotometría UV/VIS, previa mineralización ácida de las leches fermentadas para conocer su contenido total, de los sobrenadantes para estimar la fracción soluble y de los dializados para conocer la fracción dializable.

#### • Mineralización de las muestras

En balanza de precisión se pesaron 2 g de muestra en un tubo de poliestireno cristalino. Tras la adición de 8 mL de una disolución de  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$  (4:1 v/v), se procedió a la mineralización en un bloque de digestión multiplazas termostatzado.

Se inició mediante calentamiento a  $60^\circ\text{C}$  durante 45 min, posteriormente se aumentó la temperatura a  $90^\circ\text{C}$  y tras 30 min se llevó a  $120^\circ\text{C}$ , temperatura a la que se mantuvo otros 30 min. Las muestras mineralizadas se enfriaron y se diluyeron hasta un volumen final de 25 mL con agua bidestilada desionizada. De igual forma, se prepararon los blancos. El proceso se esquematiza en la figura 26.

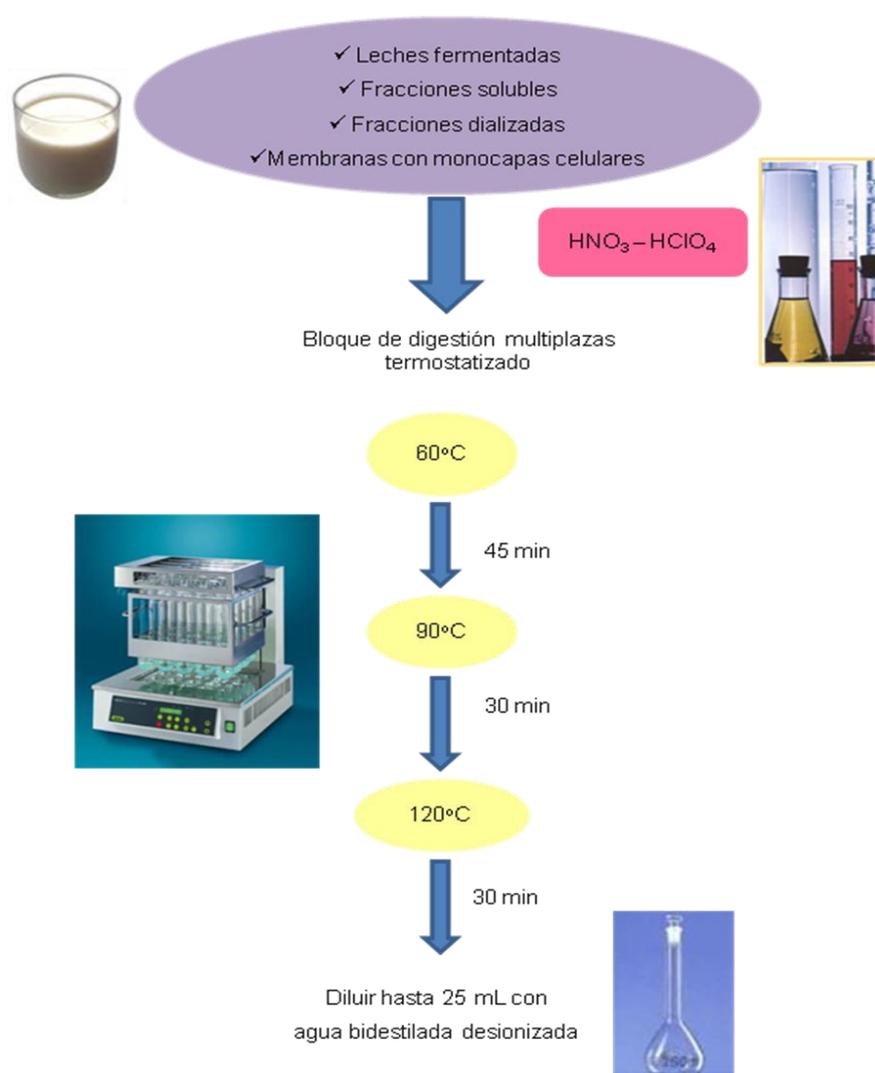


Figura 26. Mineralización de las muestras.

• **Determinación de Ca, Mg y Zn por ICP-AES**

La determinación de estos minerales se realizó mediante la técnica de espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES). Con esta técnica es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles de traza y ultratrazo, partiendo de muestras en disolución acuosa.

La muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador, donde es transformada en aerosol gracias a la acción de gas argón. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización, que consiste en un plasma generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 8000 K.

En estas condiciones, los átomos presentes en la muestra son ionizados/excitados. Al volver a su estado fundamental, estos iones o átomos excitados emiten radiaciones de una longitud de onda que es característica de cada elemento. Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud de onda. A continuación, un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones, relacionando ésta con la concentración de cada elemento en la muestra.

Para la cuantificación de Ca, Mg y Zn en las muestras, se prepararon rectas de calibrado con 6 patrones de 0,050, 0,100, 0,150, 0,200, 0,250 y 0,300 µg/mL a partir de una disolución multielemental certificada que contiene 10 µg/mL de todos estos elementos, por dilución con agua bidestilada desionizada. Se eligieron las longitudes de onda principales de cada elemento (tabla 14). Las muestras fueron analizadas por duplicado y se siguió el mismo procedimiento para los blancos.

**Tabla 14.** Longitudes de onda de cada elemento en ICP-AES.

<b>Mineral</b>	<b>Longitud de onda (λ)</b>
<b>Ca</b>	317,933 nm
<b>Mg</b>	285,213 nm
<b>Zn</b>	206,200 nm

### • Determinación de P por espectrofotometría UV/VIS

Para la obtención de la curva de calibración del P, se diluyeron 4,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1000 mL de agua bidestilada desionizada (solución A) y 10 mL de ésta en 1000 mL de dicha agua para obtener la solución B, de forma que la equivalencia es: 1 mL solución B = 10  $\mu\text{g}$  de P.

Se prepararon 9 diluciones tomando cantidades crecientes de la solución B y añadiendo 2 mL de ácido perclórico, 2 mL de la disolución de amidol y 1 mL de la disolución de molibdato amónico, para después enrasar a 25 mL con agua bidestilada desionizada (tabla 15).

**Tabla 15.** Preparación de la curva de calibración del P.

Solución B (mL)	Ác. perclórico (mL)	Disolución amidol (mL)	Disolución molibdato (mL)	Agua bidestilada desionizada (mL)
0,5	2	2	1	19,5
1	2	2	1	19
1,5	2	2	1	18,5
3	2	2	1	17
4	2	2	1	16
5	2	2	1	15
7	2	2	1	13
10	2	2	1	10
12	2	2	1	8

Tras una espera de 5 minutos, se midió la densidad óptica, utilizando una cubeta de 1 cm, a una longitud de onda de 750 nm, obteniéndose así la recta patrón.

Para la determinación de los niveles de P presentes en las muestras estudiadas, se tomaron 3 mL de la muestra mineralizada y se introdujeron en un matraz aforado de 25 mL de capacidad, para después añadir sucesivamente 1,2 mL de ácido perclórico, 1,2 mL de la disolución de amidol y 0,6 mL de la disolución de molibdato amónico, enrasando con agua bidestilada desionizada. Tras una espera de 5 minutos, se midió la densidad óptica. Las muestras fueron analizadas por duplicado. Se siguió el mismo procedimiento para los blancos.

• **Exactitud y precisión de los análisis**

La exactitud se define como la proximidad entre el valor obtenido y el valor verdadero. Su cálculo nos permite comprobar que no se producen pérdidas ni contaminaciones durante el proceso seguido. Su determinación se llevó a cabo mediante la utilización de un patrón certificado por “Community Bureau of Reference” (B.C.R. Reference Material No 063R, Trace and major elements in skim milk powder). Los valores certificados y determinados en dicho patrón se recogen en la tabla 16.

**Tabla 16.** Valores determinados y certificados para el patrón externo.

Mineral	Patrón	Valor determinado	Valor certificado
<b>Ca (mg/g)</b>	Leche desnatada en polvo (B.C.R. 063 R)	13,30±0,15	13,49±0,10
<b>Mg (mg/g)</b>		1,17±0,26	1,26±0,02
<b>P (mg/g)</b>		11,09±0,27	11,10±0,13
<b>Zn (µg/g)</b>		48,06±0,76	49,0±0,60

El término precisión hace referencia al grado de convergencia de los resultados generados por el método analítico. Ésta se controló mediante el cálculo del Coeficiente de Variación, siendo de 2,16-3,36%, 2,56-2,87%, 3,71-5,96% y 2,94-4,48% para los análisis de Ca, Mg, P y Zn, respectivamente.

**3.8. Cálculo de la biodisponibilidad de minerales**

Una vez determinados los contenidos de Ca, Mg, P y Zn en las leches fermentadas, en las fracciones solubles, dializadas, retenidas y transportadas, se calcularon los porcentajes de solubilidad, dializabilidad, transporte, retención y captación de los minerales, que se utilizan como predicción de la biodisponibilidad. Dichos porcentajes se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

✚ Solubilidad

$$\text{Solubilidad (\%)} = 100 \times S/C$$

S = cantidad de mineral soluble (µg/g muestra)

C = cantidad total de mineral (µg/g muestra)

### Dializabilidad

$$\text{Dializabilidad (\%)} = 100 \times D/C$$

D = cantidad de mineral dializado ( $\mu\text{g/g}$  muestra)

C = cantidad total de mineral ( $\mu\text{g/g}$  muestra)

### Retención, transporte y captación

Los porcentajes de retención, transporte y captación del mineral se calcularon en función de los  $\mu\text{g}$  iniciales adicionados en la cámara apical, mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Retención (\%)} = 100 \times R/C$$

R = cantidad de mineral retenido ( $\mu\text{g/pocillo}$ )

C = cantidad inicial de mineral puesta en la cámara apical ( $\mu\text{g/pocillo}$ )

$$\text{Transporte (\%)} = 100 \times T/C$$

T = cantidad de mineral transportado ( $\mu\text{g/pocillo}$ )

C = cantidad inicial de mineral puesta en la cámara apical ( $\mu\text{g/pocillo}$ )

$$\text{Captación (\%)} = 100 \times U/C$$

U = cantidad de mineral captado ( $\mu\text{g/pocillo}$ )

C = cantidad inicial de mineral puesta en la cámara apical ( $\mu\text{g/pocillo}$ )

Para tener en cuenta la solubilidad del mineral tras la digestión *in vitro* y la proporción que se transporta y se capta del mismo en los experimentos realizados con cultivos celulares, se determinó la eficiencia del transporte y de la captación. Dichos porcentajes se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Eficiencia del transporte (\%)} = (T \times S)/100$$

T = porcentaje de mineral transportado

S = porcentaje de mineral soluble

$$\text{Eficiencia de la captación (\%)} = (U \times S)/100$$

U = porcentaje de mineral captado

S = porcentaje de mineral soluble

### 3.9. Estudio estadístico

Para interpretar los datos obtenidos se usó el programa estadístico *SPSS 15.0* para Windows, con el que se efectuó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA). Como paso previo a la ejecución de un modelo paramétrico o no paramétrico, se determinó la aleatoriedad de los resultados experimentales obtenidos para las variables de respuesta. Se realizó la comprobación de:

- La distribución normal de los resultados, mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* con un nivel de significación del 5%. Si  $p > 0,05$  los datos se distribuyen normalmente.
- La homogeneidad de varianzas, mediante el test de *Levene* para un nivel de significación del 5%. Si  $p > 0,05$  existe homogeneidad de varianzas.

Se puede llevar a cabo un estudio paramétrico siempre que los datos cumplan estas dos condiciones, si alguna variable no las cumple el estudio a aplicar será el no paramétrico.

Las comparaciones se hicieron usando el test de la *t de Student* como prueba paramétrica y el test de *Kruskal-Wallis* cuando las condiciones eran no paramétricas.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN





#### 4.1. Cantidad total de Ca, Mg, P y Zn en las leches fermentadas

La leche y los derivados lácteos constituyen una excelente fuente de ciertos minerales. Con respecto a la leche de cabra, recientemente se ha demostrado que ésta presenta mayor cantidad de Ca, Mg, P, Cu, K, Fe, Mn y I que la de vaca (Haenlein, 2001; Rutherford y col., 2006; Park y col., 2007; Raynal-Ljutovac y col., 2008; Ceballos y col., 2009). Además, las leches fermentadas de cabra pueden presentar una mayor concentración mineral, en comparación con la leche de partida, debido al incremento de sólidos totales tras la adición de leche en polvo o concentrados de proteínas de suero de leche (Güler, 2007; Slacanac y col. 2010).

Coincidiendo con dichas observaciones, según los resultados obtenidos en el presente estudio, las leches fermentadas experimental y control presentaron mayor concentración de Ca, Mg, P y Zn que la leche de partida, existiendo diferencias estadísticamente significativas en el caso del Ca ( $p < 0,05$ ) y el Mg ( $p < 0,01$ ). Además, tanto la leche fermentada control como la experimental presentaron concentraciones de Ca, P y Zn significativamente superiores a las leches de cabra fermentadas comerciales (tabla 17).

**Tabla 17.** Concentraciones de Ca, Mg, P y Zn en la leche de partida y en las leches fermentadas (LF).

	Ca ( $\mu\text{g/g}$ )	Mg ( $\mu\text{g/g}$ )	P ( $\mu\text{g/g}$ )	Zn ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Leche de partida</b> (n=8)	1561,64 $\pm$ 55,26	148,96 $\pm$ 5,12	800,11 $\pm$ 236,34	5,53 $\pm$ 0,49
<b>LF control</b> (n=10)	1640,39 $\pm$ 46,77***	157,28 $\pm$ 3,76	920,41 $\pm$ 89,97**	5,82 $\pm$ 0,51**
<b>LF experimental</b> (n=10)	1640,35 $\pm$ 33,14***	155,98 $\pm$ 3,25	844,02 $\pm$ 72,89*	5,88 $\pm$ 0,40***
<b>LF comerciales</b> (n=5)	1282,09 $\pm$ 154,72	148,74 $\pm$ 26,39	697,35 $\pm$ 161,24	2,86 $\pm$ 1,37

Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Numerosos autores han estudiado la composición mineral de leches fermentadas de vaca y cabra; en la tabla 18 se muestran datos obtenidos recientemente, observándose amplia variabilidad en el proceso de elaboración con/sin adición de leche en polvo, concentrados lácteos, etc.

**Tabla 18.** Concentración total de Ca, Mg, P y Zn en leches fermentadas. Datos obtenidos por otros autores.

Ca (µg/g)	Mg (µg/g)	P (µg/g)	Zn (µg/g)	Referencia
<b>VACA</b>				
2098,5±389,9	91,2±28,9	755,4±171,3	5,82±1,14	Bergillos-Meca y col., 2013
1135,8±158,0	94,0±14,6	870,4±76,8	4,63±0,68	Ceballos y col., 2009
1088-2050	101-177	878-1391	4,3-7,3	De la Fuente y col., 2003
1336-1371	134-138	-	-	Gambelli y col., 1999
1145,0±96,0	406,0±20,0	1009,0±48,0	7,28±0,69	Güler y Sanal., 2009
1010,0±60,00	96,0±2,0	-	4,60±0,10	Martín-Diana y col., 2003
1936±353,6	150,1±29,7	-	4,03±0,81	Navarro-Alarcón y col., 2011
<b>CABRA</b>				
1831,4±504,2	116,1±39,5	852,5±119,3	6,23±0,61	Bergillos-Meca y col., 2013
1585,7±158,0	129,2±14,6	1189,7±76,8	5,28±0,68	Ceballos y col., 2009
1310±30	123±2	952±6	4,0±0,1	De la Fuente y col., 2003
1455±3,6	587±11,7	1052±24,0	6,85±0,25	Güler, 2007
1356,0±94,0	399,0±48,0	1277,0±53,0	5,16±0,47	Güler y col., 2009
1110,0±60,0	106,0±1,0	-	4,50±0,10	Martín-Diana y col., 2003
1940±421,5	178,2±32,0	-	4,46±0,93	Navarro-Alarcón y col., 2011
1405	149	1253	3,37	Park, 2000
1287	148	1164	4,10	

Como se observa, la concentración de Ca encontrada en nuestro estudio en las leches de cabra fermentadas comerciales (1282,09±154,72 µg/g) es algo más baja que la descrita en bibliografía. Los valores de las leches fermentadas control y experimental (1640,39±46,77 y 1640,35±33,14 µg/g, respectivamente) son superiores a los descritos por otros autores para leches de cabra fermentadas, excepto en el caso de Bergillos-Meca y col. (2013) y Navarro-Alarcón y col. (2011), que observaron que sus datos eran superiores a los de otros estudios y explicaron que existía una gran variabilidad debido

al amplio rango de leches fermentadas analizadas y a diversos factores relacionados con la leche utilizada como materia prima. Los niveles de Mg encontrados en los tres tipos de leches fermentadas (148,74–157,28 µg/g) son similares a los descritos previamente. En el caso del P, los valores observados en la leche fermentada control y experimental son similares a los descritos anteriormente para leche de vaca fermentada pero menores que los de leche caprina, sobre todo el valor de leches fermentadas comerciales (697,35±161,24 µg/g). Esto también podría ser debido a la variabilidad de productos analizados por los diferentes autores. Güler (2007) explicó que la concentración de minerales era directamente proporcional a la cantidad de proteína y grasa del producto, por lo que en el caso de los comerciales se podría esperar una notable variabilidad. Por último, los niveles de Zn encontrados en las leches fermentadas control y experimental se sitúan en el rango descrito en otros estudios, no ocurre así con las leches fermentadas comerciales analizadas, en las que se observó un valor más bajo (2,86±1,37 µg/g), respecto a estos datos.

Las diferencias observadas al comparar los resultados obtenidos con los valores bibliográficos sugieren variaciones en el contenido mineral en función de la raza del animal, alimentación, etapas de lactancia y factores ambientales, entre otros, y por supuesto, del método de elaboración, que ejerce una notable influencia (Park, 2000; Cabrera-Vique y col., 2013b).

Closa y col. (2003) determinaron la concentración mineral en leches y yogures, concluyendo que el desnatado de la leche incrementó la concentración de los mismos, especialmente de Ca. En el caso de yogures, el contenido mineral se incrementó con la adición de leche en polvo o evaporada. El mayor contenido en extracto seco magro de la leche fermentada en relación con la leche da lugar a una mayor concentración de iones inorgánicos (Quintana, 2011). Park (2000) también observó que la concentración mineral en leches fermentadas era proporcional al contenido de sólidos totales y De la Fuente y col. (2003) concluyeron que la cantidad de Ca, Mg, P y Zn en yogures puede ser mayor que en la leche de partida, debido a la posible adición de ingredientes lácteos. Explicaron que los niveles de estos minerales no se afectan por el contenido graso, ya que no se encuentran unidos a grasa en gran proporción, como sí ocurre con el Cu y el Fe, puesto que una fracción se encuentra ligada a la membrana del glóbulo graso.

Aunque el método más común para incrementar los sólidos totales en la elaboración de leches fermentadas es la adición de leche en polvo, también se suelen añadir concentrados de proteínas. Navarro-Alarcón y col. (2011) describieron que los niveles

de Ca, Mg y Zn en leches fermentadas de cabra y vaca se incrementan con el contenido proteico. Esto ya había sido observado por Martín-Diana y col. (2003) para el Mg.

En este sentido, la ultrafiltración puede suponer un importante avance en la concentración de la leche de partida para la producción de productos fermentados, ya que paralelamente al incremento del contenido proteico se eleva el contenido de ciertos minerales.

Durante la ultrafiltración de la leche, los minerales solubles, la lactosa, los compuestos de bajo peso molecular y el agua pasan a través de la membrana hacia el filtrado, mientras que en el retenido se concentran proteínas, grasa y ciertas sales insolubles (Baldasso y col., 2011; Liu y col., 2014). Tolosa y col. (2006) observaron una mayor concentración de proteínas en yogures elaborados con leche ultrafiltrada, respecto a los preparados con adición de leche en polvo. Vyas y col. (2003) observaron que sólo el 16% de Ca presente en leche desnatada pasó al filtrado.

Está demostrado que una parte de las sales minerales se encuentran disueltas en el suero, sin embargo una gran proporción de minerales de la leche se encuentran formando complejos y asociados a la caseína de la leche, formando el denominado fosfato cálcico coloidal, que actúa como puente de unión entre las submicelas de caseína y es responsable, junto con las interacciones hidrófobas, de la integridad de las micelas de caseína. Las sales más importantes son las de Ca, Na, K y Mg, y se encuentran como fosfatos, cloruros, citratos y caseinatos. Una micela está formada por unas 400 a 500 submicelas y su tamaño depende en gran medida del contenido de iones Ca (Gösta, 2003; Moreno y col., 2013).

Por tanto, el proceso de ultrafiltración podría incrementar la concentración de dichos minerales. A pH 6,7 en leche cruda, aproximadamente dos tercios del Ca y dos tercios del P están asociados a micelas de caseína (Gastaldi y col., 1996; De la Fuente y col., 2003; Baró y col., 2010). De la misma forma, el 65% del Mg presente en leche de vaca está en forma soluble pero el resto está asociado a micelas de caseína, lo que supone un tercio aproximado del contenido total (Flynn y col., 1997; Baró y col., 2010). Se ha descrito también que el 90-95% del contenido de Zn de leche de vaca se encuentra unido a caseínas y sólo una pequeña cantidad está unida a proteínas del suero y ligandos de bajo peso molecular (De la Fuente y col., 2003).

Premaratne y col. (1991) ultrafiltraron leche desnatada y demostraron una concentración parcial de Ca, Mg, Zn, Fe, Cu y Mn en el retenido. Mehaia (1996) encontró mayores

concentraciones de Ca, P, Na, K, Mg, Zn, Cu y Fe en el retenido tras someter leche de camella desnatada al proceso de ultrafiltración.

También comentar que los niveles de Ca, P y Mg están en equilibrio entre las fases líquida y coloidal de la leche y entre los factores que influyen en ese equilibrio, la temperatura es el más importante. Diversos autores han descrito que entre 2-4°C, temperatura de almacenamiento de la leche cruda, la concentración de Ca y P soluble aumenta, debido a la migración desde la fase coloidal, induciendo una disminución en la carga mineral de las micelas de caseína. En cambio, entre 37-40°C las concentraciones de Ca y P soluble disminuyen rápidamente. Procediendo a la ultrafiltración a 20-40°C se consigue una mayor concentración de estos minerales, frente a temperaturas de 2-10°C (Schmitt y col., 1993; Liu y col., 2014).

En base a estas observaciones, el calentamiento de la leche para su desnatado y justo antes de proceder a la ultrafiltración ( $T^a \approx 30^\circ\text{C}$ ) podría favorecer la migración de minerales hacia la fase coloidal, y con ello la concentración de los mismos en el retenido.

#### **4.2. Biodisponibilidad *in vitro* de Ca, Mg, P y Zn en las leches fermentadas**

La biodisponibilidad de minerales en distintos alimentos y dietas está siendo objeto de numerosos trabajos de investigación. En lo que respecta a la leche de cabra, ésta proporciona minerales altamente biodisponibles, en parte debido a su asociación con la caseína (López-Aliaga y col., 2009; Bergillos-Meca y col., 2013).

En las leches fermentadas, los minerales pueden formar sales parcialmente solubles debido a la acidez del medio, así como formar complejos con productos resultantes de la hidrólisis proteica. Estos mecanismos favorecen su absorción (Baró y col., 2010). Además, la fermentación de la leche produce solubilización del Ca, Mg y P y una solubilización parcial de minerales traza, ejerciendo un efecto positivo en la biodisponibilidad mineral.

También se ha observado que algunos microorganismos probióticos adicionados en productos lácteos fermentados podrían aumentar la biodisponibilidad y absorción de ciertos minerales (Turpin y col., 2010; Chian y col., 2012; Bergillos-Meca y col., 2013).

En cuanto a los métodos para el estudio de la biodisponibilidad mineral, éstos deberían ser capaces de reproducir la absorción intestinal (Turco y col., 2011). En el presente estudio, además de determinar la bioaccesibilidad mediante métodos *in vitro* de

solubilidad y diálisis, se han incluido ensayos con la línea celular Caco-2. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en estudios de absorción de nutrientes y fármacos, contribuyendo a una mejor evaluación de la absorción intestinal y metabolismo de los mismos y representando en ciertos casos, el paso previo a los estudios *in vivo* (Liu y col., 2007; Algahtani y col., 2013).

Así, una vez obtenidos los datos de la fracción soluble y dializada de dichos minerales en las muestras de leches fermentadas, se relacionaron con la cantidad total para calcular la biodisponibilidad *in vitro* de cada mineral, expresada como porcentaje de solubilidad y porcentaje de dializabilidad.

En cuanto a los ensayos *in vitro* con cultivos celulares, una vez obtenidos los datos de la fracción transportada y retenida de dichos minerales en las muestras de leches fermentadas, se calcularon los porcentajes de transporte, retención y captación (transporte + retención) del mineral. La eficiencia se calculó teniendo en cuenta la solubilidad del mineral tras la digestión *in vitro* y la proporción que se transporta y capta del mismo en los experimentos realizados con cultivos celulares.

Previamente a dichos ensayos, fue necesario comprobar que los sobrenadantes no dañaban el cultivo celular, y una vez sembradas las células en las placas bicamerales, se comprobó la integridad y confluencia de la monocapa celular.

### • Ensayos de viabilidad y actividad metabólica celular

Tras ensayar los sobrenadantes procedentes de la digestión *in vitro* (apartado 3.4.) sin ajustar y ajustados, así como también a distintas diluciones con la solución de ajuste, se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla 19.

Las células incubadas con los sobrenadantes ajustados y diluidos 1/2 nunca presentaron una viabilidad y actividad metabólica inferior al 85%. Este resultado se confirmó mediante la realización de ensayos de viabilidad con el método del azul tripán, obteniéndose unos valores medios de 89% de viabilidad.

El daño producido por los sobrenadantes sin ajustar denota la importancia de un ajuste previo de osmolaridad, HEPES y pH.

Por tanto, los sobrenadantes obtenidos tras la digestión *in vitro* fueron utilizados en los ensayos de transporte y captación de minerales tras ser ajustados (310 mOsm/kg, 50 mM HEPES, pH 7) y diluidos 1/2 en solución de ajuste.

**Tabla 19.** Viabilidad y actividad metabólica de las células Caco-2 en contacto con los sobrenadantes procedentes de la digestión *in vitro*.

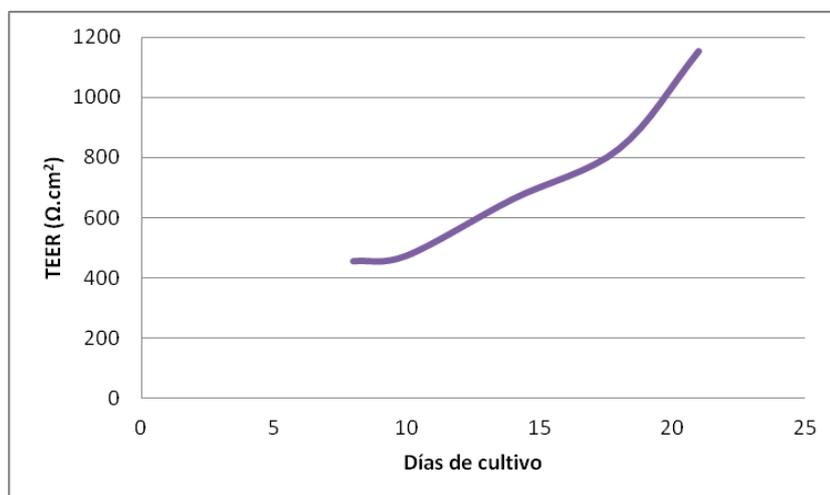
	Dilución en solución de ajuste <sup>a</sup>	Viabilidad (%)	Actividad metabólica (%)
<b>Sobrenadantes</b>			
<b>Leche fermentada experimental</b>	1	43,61±0,48	29,39±6,14
	1/2	46,63±1,78	29,56±5,17
	1/3	41,78±6,25	29,24±0,81
	1/5	48,18±3,34	30,86±2,85
<b>Leche fermentada comercial</b>	1	42,59±0,43	27,26±2,16
	1/2	43,77±1,23	30,92±8,07
	1/3	40,55±5,91	35,52±15,54
	1/5	43,96±0,34	30,50±6,74
<b>Sobrenadantes ajustados<sup>b</sup></b>			
<b>Leche fermentada experimental</b>	1	72,39±10,53	57,23±14,75
	1/2	100,17±8,98	114,01±27,32
	1/3	107,56±5,51	96,67±9,22
<b>Leche fermentada comercial</b>	1	82,26±5,01	87,57±15,60
	1/2	93,82±2,83	90,14±13,25
	1/3	93,42±2,88	91,01±11,87

<sup>a</sup> Solución de ajuste: glucosa, HEPES, NaCl

<sup>b</sup> Ajuste a 310 mOsm/kg, 50 mM HEPES y pH 7

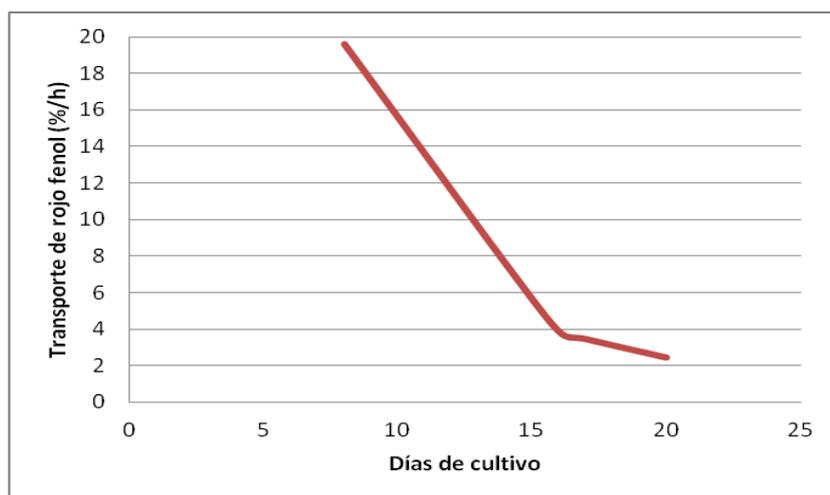
• **Integridad y confluencia de la monocapa**

El aumento de la TEER a lo largo de los 21 días de cultivo tras la siembra de las células, se representa en la figura 27. Las monocapas utilizadas en los ensayos siempre alcanzaron valores mayores de  $700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .



**Figura 27.** Aumento de la TEER en función del tiempo.

El descenso del transporte de rojo fenol a lo largo de los 21 días de cultivo tras la siembra de las células, se representa en la figura 28. Las monocapas con porcentajes de transporte superiores al 5% fueron rechazadas para la realización de los ensayos, los valores medios alcanzados se aproximaron al 3% de transporte.



**Figura 28.** Transporte de rojo fenol en función del tiempo.

Una vez ajustados y diluidos los sobrenadantes, y comprobada la integridad y confluencia de la monocapa, se procedió a la realización de los ensayos de biodisponibilidad, y a la determinación de minerales en las distintas fracciones.

- **Calcio**

Con respecto a la biodisponibilidad *in vitro* del Ca, en el presente estudio las leches fermentadas control y experimental mostraron mayor solubilidad y dializabilidad frente a las comerciales, existiendo diferencias estadísticamente significativas en la fracción soluble ( $p < 0,001$ ), porcentaje de solubilidad ( $p < 0,001$ ) y fracción dializable ( $p < 0,01$  en el caso de la leche fermentada control y  $p < 0,05$  en la experimental).

Estos datos coinciden con un estudio previo en el que nuestro grupo de investigación observó una mayor dializabilidad de Ca en leches fermentadas con *L. fermentum* D3 desarrolladas experimentalmente, frente a leches fermentadas comerciales (Bergillos-Meca y col., 2013).

Los datos obtenidos para este mineral se recogen en las tablas 20 y 21, y su biodisponibilidad se esquematiza en la figura 29.

Tras estudiar la biodisponibilidad en cultivos celulares, se observó que en el caso de las dos leches fermentadas elaboradas en el presente estudio se transportó una cantidad de Ca significativamente mayor frente a las comerciales. En cuanto a la eficiencia del transporte, se observaron datos superiores en las leches fermentadas control y experimental que en las comerciales, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (figura 29). Al comparar la leche fermentada experimental frente a la leche fermentada control, se encontró una retención de Ca significativamente superior, probablemente por efecto del probiótico.

Además, en la leche fermentada experimental, se observó un valor de Ca captado y una eficiencia de la captación significativamente superior que en las comerciales. En el caso de la leche fermentada control no se observaron diferencias significativas. Por tanto, podemos considerar que la leche fermentada experimental con *L. plantarum* C4 incrementa la biodisponibilidad, en comparación con las leches de cabra fermentadas disponibles en el mercado.

**Tabla 20.** Concentración de **calcio** en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión *in vitro* de las leches fermentadas (LF).

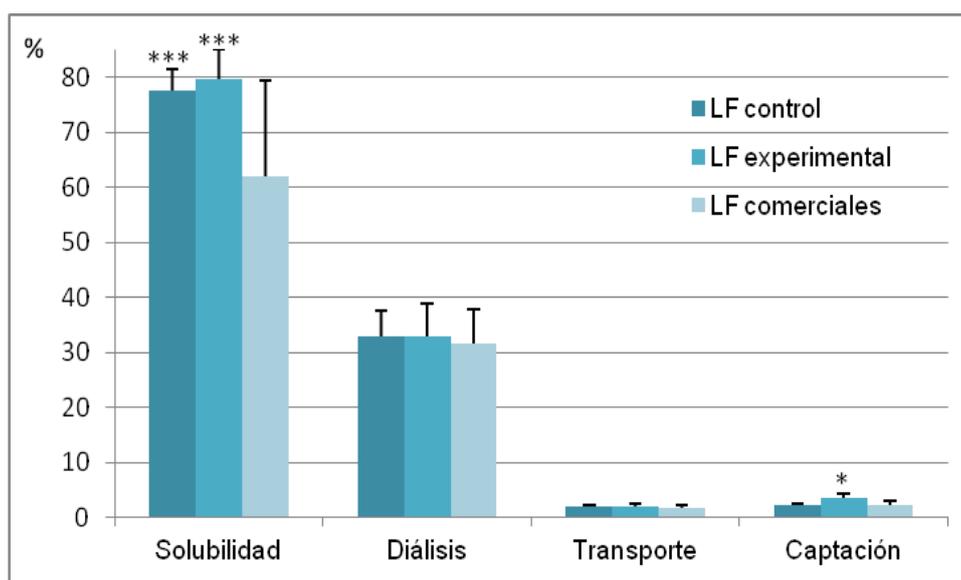
	Fracción soluble (µg/g)	Solubilidad (%)	Fracción dializada (µg/g)	Dializabilidad (%)
<b>LF control</b> (n=10)	1273,56±59,88***	77,63±3,92***	538,83±72,12**	32,93±4,57
<b>LF experimental</b> (n=10)	1305,68±78,75***	79,64±5,36***	540,80±92,86*	33,01±5,81
<b>LF comerciales</b> (n=5)	785,12±251,90	62,07±17,46	432,05±103,77	31,66±6,22

Diferencias estadísticamente significativas respecto a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Tabla 21.** Retención, transporte y captación de **calcio** en las leches fermentadas (LF) tras los ensayos con células Caco-2.

	Ca añadido (µg)	Retención		Transporte			Captación		
		(µg)	(%)	(µg)	(%)	Eficiencia (%)	(µg)	(%)	Eficiencia (%)
<b>LF control</b> (n=6)	220,20	0,57±0,45	0,26±0,21	5,81±0,87** <sup>a</sup>	2,64±0,39	2,05±0,31	6,55±0,57	2,97±0,26	2,31±0,20
<b>LF experimental</b> (n=6)	207,60	3,60±,51* <sup>b</sup>	1,74±0,73* <sup>b</sup>	5,23±1,24* <sup>a</sup>	2,52±0,60	2,01±0,48	9,23±2,28* <sup>a</sup>	4,45±1,10	3,54±0,87* <sup>a</sup>
<b>LF comercial</b> (n=6)	147,63	1,85±1,93	1,28±1,35	4,07±0,36	2,78±0,28	1,65±0,52	5,94±1,89	4,12±1,35	2,26±0,87

<sup>a</sup> Respecto a LF comerciales. <sup>b</sup> Respecto a LF control. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figura 29.** Biodisponibilidad *in vitro* de **calcio** en las leches fermentadas (LF).  
Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

La tabla 22 muestra los datos bibliográficos de biodisponibilidad de Ca *in vitro* en productos lácteos, concordando con nuestros resultados, si bien los datos en leches fermentadas de cabra son muy escasos.

**Tabla 22.** Biodisponibilidad de **calcio** en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores.

Tipo de muestra	Biodisponibilidad (%)	Método	Referencia
Bebidas de fruta (base leche entera)	93,50-99,29	Solubilidad	Cilla y col., 2011
Bebidas de fruta (base leche desnatada)	84,43-99,39		
Leche de cabra	30-38	Solubilidad	Remeuf y col., 1993
Leche UHT	63,2±2,40	Solubilidad	Seiquer y col., 2010
Leche sobrecalentada	48,31±2,46		
LF de cabra con <i>L. fermentum</i> D3	39,60±9,28	Dializabilidad	Bergillos-Meca y col., 2013
LF comerciales	24,71±7,78		
Leche humana	19,6±1,1	Dializabilidad	Bosscher y col., 2003
Fórmula infantil	13,5±0,3		
Fórmula infantil + fibra	11,7-17,2		

**Tabla 22.** Continuación.

<b>Yogur</b>	42,17-42,44		
<b>Yogur enriquecido en Fe</b>	42,05-46,31	Dializabilidad	Drago y col., 2002
<b>Leche acidificada</b>	42,63-43,20		
<b>Leche acidificada enriquecida en Fe</b>	42,27-46,88		
<b>Yogur enriquecido en Fe</b>	34,97-46,31	Dializabilidad	Drago y col., 2008
<b>Leche entera</b>	25,87±2,35		
<b>Leche desnatada</b>	28,19±2,35	Dializabilidad	Gülfem y col., 2005
<b>Leche + Ca</b>	19,76±2,35		
<b>Leche crecimiento</b>	26,72±2,35		
<b>Fórmulas infantiles a base de leche</b>	11,0-13,0	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2001
<b>Fórmulas infantiles</b>	12		
<b>Fórmulas con proteínas hidrolizadas</b>	34	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2003
<b>Fórmulas a base de leche</b>	4,3-28,2	Dializabilidad	Roig y col., 1999
<b>Fórmulas a base de leche</b>	6,7	Dializabilidad	Shen y col., 1994
<b>Bebidas de fruta (base leche entera)</b>	11,35-16,54	Línea celular	Cilla
<b>Bebidas de fruta (base leche desnatada)</b>	11,50-19,8	Caco-2	y col., 2011
<b>Fórmulas a base de leche</b>	5,94-7,24	Línea celular Caco-2	Jovaní y col., 2001

Cabe destacar que sólo una pequeña proporción de mineral soluble fue absorbido por las células Caco-2, hecho que ya habían observado Cilla y col. (2011). Esto refleja la enorme diferencia existente entre los datos obtenidos mediante ensayos de digestión *in vitro* y los realmente absorbidos por los enterocitos, y demuestra que los porcentajes de solubilidad y dializabilidad son sólo estimaciones de la biodisponibilidad mineral. La combinación de ambos modelos es necesaria para entender mejor el proceso de absorción mineral en el organismo.

En la leche, hay un equilibrio del Ca entre las fases micelares y la acuosa. Cuando se produce una acidificación (como ocurre con la fermentación de la lactosa a ácido láctico), éste se solubiliza y pasa a hacia la fase acuosa (Moreno y col., 2013).

Bergillos-Meca y col. (2013) sugirieron que la biodisponibilidad de Ca, Mg y P en leche fermentada de cabra probablemente estaba aumentada debido al efecto fermentador ejercido por la cepa *L. fermentum* D3. Explicaron que ésta podría aumentar los niveles de sustancias quelantes en la leche de cabra, como caseinfosfopéptidos y/o ácidos grasos de cadena corta, que son capaces de mantener estos minerales en forma soluble. De forma similar podría comportarse *L. plantarum* C4.

Pérez-Conesa y col. (2006) encontraron que los probióticos *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum* disminuyen el pH, y provocan que la absorción del Ca se incremente. De la misma forma, se ha descrito que la cepa *Lactobacillus salivarius* UCC118 incrementó la captación de Ca en células Caco-2, y que se veía favorecida por la presencia de prebióticos (Gilman y col., 2006). Estas bacterias pueden generar en el intestino grueso subproductos como ácidos grasos de cadena corta y otros ácidos orgánicos que contribuyen a reducir el pH luminal y a aumentar la cantidad de Ca soluble, incrementando así su absorción.

Se ha descrito que los ácidos grasos de cadena corta también pueden influir directamente en la ruta transcelular modificando el cambio de  $H^+$  intracelular por  $Ca^{2+}$  presente en el colon (Cashman, 2003).

El mecanismo por el que algunos probióticos aumentan el transporte transepitelial y la captación de Ca no está claro; Brassart y col. (1998) concluyeron que ciertos microorganismos disminuyen el pH en el entorno de las células Caco-2, esto podría incrementar la solubilidad del Ca. Dunne y col. (2001) explicaron que la inducción de estos cambios también depende de la capacidad de adhesión de los microorganismos a las células. En el presente trabajo la cepa *L. plantarum* C4 mostró propiedades de adhesión deseadas (Capítulo IV).

Otra explicación es que la bacteria influya directamente en la absorción del Ca modulando la función celular de las Caco-2; Mack y col. (2003) describieron que algunas cepas de *Lactobacillus* pueden incrementar la transcripción y translación de proteínas para la captación de Ca en la superficie apical. Encontraron una captación aumentada, pero no observaron un mayor transporte. Destacaron por ello, la necesidad de llevar a cabo más estudios en esta área poco investigada.

Jovaní y col. (2001) estimaron la biodisponibilidad de Ca, Fe y Zn en fórmulas infantiles empleando el modelo de digestión *in vitro* y la línea celular Caco-2. Tras estudiar la captación mineral en digeridos de dichas fórmulas y en soluciones estándar de minerales, sugirieron la presencia de ciertos componentes en los digeridos que aumentaban la absorción mineral. Observaron que la absorción de Ca incrementó con la cantidad de elemento presente, coincidiendo con otros autores como Roig y col. (1999) (tabla 22).

Por otro lado, Cilla y col. (2011) estudiaron la biodisponibilidad mineral en bebidas de fruta a base de leche entera y leche desnatada, empleando el método de solubilidad y transporte con células Caco-2, y observaron que la biodisponibilidad fue mayor en las bebidas a base de leche desnatada, aunque no encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Numerosos estudios en animales han mostrado que los fosfopéptidos de la caseína, que son liberados durante la digestión de la misma, aumentan la absorción de Ca en el intestino (FitzGerald, 1998; Jovaní y col., 2001; McKinnon y col., 2010). Éstos podrían incrementar la solubilidad del Ca uniéndose a él en el intestino delgado y manteniéndolo en forma soluble; de modo que un incremento en la caseína de la dieta podría estimular la biodisponibilidad de Ca. McKinnon y col. (2010) estudiaron dicha hipótesis en ratas y efectivamente observaron que la leche de cabra con mayor concentración de caseína que la de vaca incrementó la absorción de Ca. Suplementar la leche con caseinfosfopéptidos podría tener importantes beneficios en la biodisponibilidad del Ca, y por tanto, en el valor nutricional de las leches fermentadas (De la Fuente y col., 2003).

En los últimos años se ha despertado gran interés por determinados péptidos bioactivos presentes en la leche, ya que además de su interés nutricional han mostrado propiedades inmunomoduladoras, antimicrobianas, antihipertensivas y antitrombóticas. Éstos pueden producirse durante la digestión normal de la caseína en el tracto gastrointestinal, en la fermentación microbiana de la leche, o mediante hidrólisis por enzimas proteolíticas (Moreno y col., 2013).

Atendiendo a estos resultados, podríamos considerar que el aumento de la biodisponibilidad de Ca en las leches fermentadas experimental y control también puede ser debido a la concentración de la caseína mediante el proceso de ultrafiltración.

Aunque se han llevado a cabo diversos estudios sobre la biodisponibilidad de Ca en productos lácteos, tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando que la leche de cabra aumenta la absorción y utilización del mismo frente a la de vaca (Campos y col., 2003;

Pérez-Conesa y col., 2006), pocos son los estudios con células Caco-2. De forma que el estudio realizado es novedoso y de gran interés, ya que aporta nuevos datos y contribuye a un mejor entendimiento del proceso de absorción mineral.

### • Magnesio

Tras el estudio de la biodisponibilidad *in vitro* de Mg, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las leches fermentadas control y experimental, y en ambas fue superior que en leches fermentadas comerciales. En el caso de la leche fermentada control, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la solubilidad, fracción dializada y dializabilidad ( $p < 0,05$ ), mientras que la leche fermentada experimental mostró ser más soluble ( $p < 0,01$ ) y presentó una mayor fracción dializada ( $p < 0,05$ ) que las comerciales.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, la biodisponibilidad *in vitro* de Mg también fue superior en la leche fermentada experimental con *L. fermentum* D3 frente a las comerciales, aunque sólo se observó una tendencia a la significación (Bergillos-Meca y col., 2013).

Los datos obtenidos para este mineral se recogen en las tablas 23 y 24, y su biodisponibilidad se esquematiza en la figura 30.

En lo que respecta a la biodisponibilidad empleando la línea celular Caco-2, los mayores valores tanto de transporte y captación como de eficiencias de transporte y captación se presentaron en la leche fermentada experimental, aunque no fueron estadísticamente significativos.

La leche fermentada control mostró una eficiencia del transporte significativamente mayor frente a las comerciales, mientras que en el caso de la leche fermentada experimental se observó una tendencia a la significación. Este resultado es de gran interés, ya que nos muestra una mayor biodisponibilidad en células Caco-2 del Mg en las leches fermentadas elaboradas.

Estos valores demuestran una vez más que no todo el mineral soluble se absorbe por células Caco-2, sino que sólo lo hace una pequeña proporción. Si bien no hay datos de biodisponibilidad de Mg con la línea celular, esto ha sido observado para otros minerales (Jovaní y col., 2001; Perales y col., 2006; Cilla y col., 2011).

**Tabla 23.** Concentración de **magnesio** en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión *in vitro* de las leches fermentadas (LF).

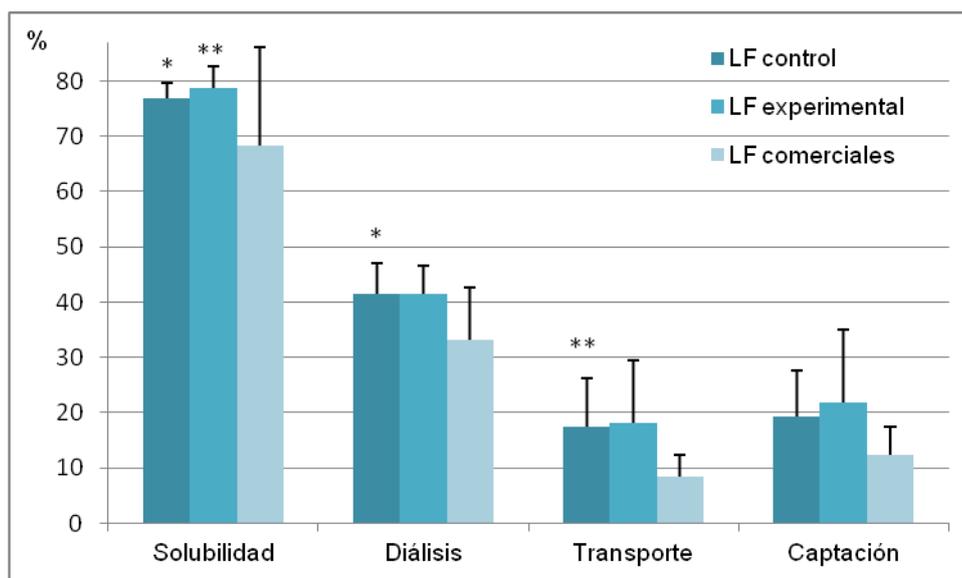
	Fracción soluble (µg/g)	Solubilidad (%)	Fracción dializada (µg/g)	Dializabilidad (%)
<b>LF control</b> (n=10)	121,06±3,99	76,92±2,67*	65,24±8,23*	41,57±5,42*
<b>LF experimental</b> (n=10)	122,81±6,27	78,70±3,95**	64,58±7,45*	41,53±5,10
<b>LF comerciales</b> (n=5)	101,84±33,52	68,32±17,83	53,48±5,97	33,17±9,44

Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

**Tabla 24.** Retención, transporte y captación de **magnesio** en las leches fermentadas (LF) tras los ensayos con células Caco-2.

	Mg añadido (µg)	Retención		Transporte			Captación		
		(µg)	(%)	(µg)	(%)	Eficiencia (%)	(µg)	(%)	Eficiencia (%)
<b>LF control</b> (n=6)	25,31	0,22±0,31	0,88±1,21	5,77±2,85	22,79±11,26	17,53±8,66**	6,33±2,74	25,02±10,83	19,24±8,33
<b>LF experimental</b> (n=6)	23,84	0,68±0,16	2,85±0,68	5,52±3,43	23,15±14,39	18,22±11,32	6,60±3,98	27,70±16,69	21,80±13,13
<b>LF comercial</b> (n=6)	23,14	1,04±0,74	4,21±2,58	3,05±0,85	13,38±4,11	8,45±3,99	4,64±1,37	18,56±4,59	12,45±5,05

Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figura 30.** Biodisponibilidad *in vitro* de **magnesio** en las leches fermentadas (LF).

Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Aunque son reducidos los datos bibliográficos de biodisponibilidad de Mg en derivados lácteos, la tabla 25 muestra los obtenidos por otros autores.

**Tabla 25.** Biodisponibilidad de **magnesio** en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores.

Tipo de muestra	Biodisponibilidad (%)	Método	Referencia
Leche de cabra	66	Solubilidad	Remeuf y col., 1993
LF de cabra con <i>L. fermentum</i> D3	36,22±6,70	Dializabilidad	Bergillos-Meca y col., 2013
LF comerciales	29,31±8,21		
Fórmulas infantiles a base de leche	24,5-26,6	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2001
Fórmulas infantiles	26	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2003
Fórmulas con proteínas hidrolizadas	35		

Aunque el Mg en los lácteos no es tan abundante como el Ca o el P, también se distribuye entre las micelas de caseína y la fase acuosa, dependiendo del pH del medio, y solubilizándose en la fase acuosa cuando la leche se acidifica (Moreno y col., 2013).

Pantako y col. (1992) publicaron que el comienzo de la absorción de Mg es más rápido con dietas ricas en caseínas de leche, principalmente  $\beta$ -caseínas, en comparación con dietas ricas en proteínas del lactosuero, demostrando la importancia de los productos lácteos en la biodisponibilidad de este mineral. Explicaron que los yogures elaborados con adición de caseínas podrían incrementar la absorción de Mg. Por lo que podemos considerar en nuestro caso, que la concentración de caseínas mediante la ultrafiltración puede favorecer la biodisponibilidad del mismo.

Diversos autores han estudiado la biodisponibilidad de Mg *in vivo* con ratas, y han encontrado valores superiores en el caso de leche de cabra frente a leche de vaca (López-Aliaga y col., 2003, 2010; Pérez-Conesa y col., 2006). Estos últimos sugirieron que el alto contenido de ligandos como citratos podría ayudar a mantener el mineral más soluble.

### • Fósforo

En lo que respecta a la biodisponibilidad *in vitro* del P, en el presente estudio se observó que tanto la leche fermentada control como la experimental presentaron mayores valores que las comerciales, existiendo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de diálisis en ambos casos ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ , respectivamente).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio previo en el que la dializabilidad de P en una leche fermentada experimental con *L. fermentum* D3 fue significativamente superior que en las leches fermentadas comerciales, probablemente gracias a la alta concentración de sustancias quelantes capaces de mantener el mineral en forma soluble (Bergillos-Meca y col., 2013).

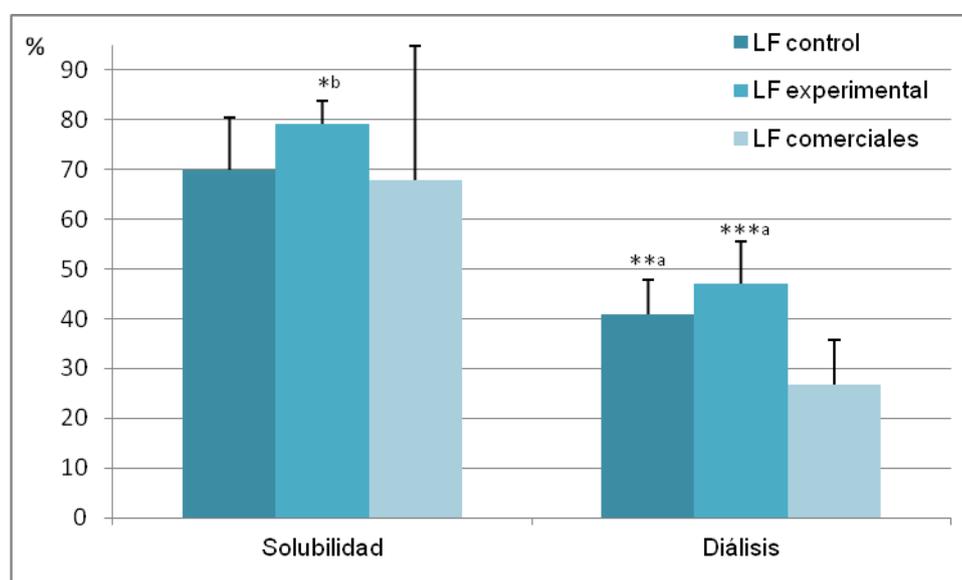
Además, al comparar la leche fermentada control y la experimental encontramos que esta última presentó mayor biodisponibilidad *in vitro* de P, existiendo diferencias significativas en la solubilidad; dicha cepa podría favorecer la absorción de este mineral. Esta observación coincide con anteriores estudios, que sugieren que la absorción podría verse aumentada gracias a que la cepa podría incrementar ciertas sustancias que mantienen el mineral en forma soluble (Gilman y col., 2006; Bergillos-Meca y col., 2013).

Los datos obtenidos para este mineral se recogen en la tabla 26, y su biodisponibilidad se esquematiza en la figura 31.

**Tabla 26.** Concentración de **fósforo** en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión *in vitro* de las leches fermentadas (LF).

	Fracción soluble ( $\mu\text{g/g}$ )	Solubilidad (%)	Fracción dializada ( $\mu\text{g/g}$ )	Dializabilidad (%)
<b>LF control</b> (n=10)	638,96 $\pm$ 92,41	69,99 $\pm$ 10,33	335,55 $\pm$ 88,97	40,84 $\pm$ 6,84 <sup>**a</sup>
<b>LF experimental</b> (n=10)	630,39 $\pm$ 99,36	79,05 $\pm$ 4,71 <sup>*b</sup>	366,29 $\pm$ 54,94	46,93 $\pm$ 8,68 <sup>***a</sup>
<b>LF comerciales</b> (n=5)	506,94 $\pm$ 240,10	67,84 $\pm$ 26,94	297,43 $\pm$ 121,30	26,88 $\pm$ 8,88

<sup>a</sup> Respecto a LF comerciales. <sup>b</sup> Respecto a LF control. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001.



**Figura 31.** Biodisponibilidad *in vitro* de **fósforo** en las leches fermentadas (LF).

<sup>a</sup> Respecto a LF comerciales. <sup>b</sup> Respecto a LF control. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001.

Al igual que el Ca y el Mg, la disminución de pH en los procesos de fermentación, puede dar lugar a la transferencia del P de la fase micelar hacia la soluble (Moreno y col., 2013).

Se ha afirmado que la leche de cabra es una excelente fuente de P biodisponible (Guéguen y col., 1997). Diversos autores han estudiado la biodisponibilidad de P en productos lácteos. Sin embargo, no existen tantos datos como en el caso del Ca o el Zn. La tabla 27 muestra los datos de biodisponibilidad mineral *in vitro* en productos lácteos, obtenidos por otros autores en estudios recientes.

Pérez-Llamas y col. (2001) determinaron la biodisponibilidad *in vitro* de P en fórmulas infantiles a base de proteína de leche de vaca; observaron que el porcentaje dializado era diferente en función del fabricante y reportaron una mayor fracción dializada de P en las fórmulas a base de leche, frente a aquellas a base de soja. Posteriormente, estudiaron el efecto de la hidrólisis proteica en fórmulas infantiles y encontraron un aumento en la biodisponibilidad *in vitro* de P, frente a fórmulas convencionales (Pérez-Llamas y col., 2003).

En general, la biodisponibilidad de este mineral se ha estudiado empleando métodos *in vitro*. En lo que respecta a métodos *in vivo*, se ha observado una mejor absorción y utilización de P en leche de cabra frente a leche de vaca (Campos y col., 2003; Pérez-Conesa., 2006).

**Tabla 27.** Biodisponibilidad de **fósforo** en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores.

Tipo de muestra	Biodisponibilidad (%)	Método	Referencia
Bebidas de fruta (base leche entera)	88,64-97,54	Solubilidad	Cilla y col., 2011
Bebidas de fruta (base leche desnatada)	84,65-99,25		
Leche de cabra	39	Solubilidad	Remeuf y col., 1993
LF de cabra con <i>L. fermentum</i> D3	74,23±9,36	Dializabilidad	Bergillos-Meca y col., 2013
LF comerciales	61,37±15,10		
Fórmulas infantiles a base de leche	40,3-46,6	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2001
Fórmulas infantiles	38	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2003
Fórmulas con proteínas hidrolizadas	44		
Bebidas de fruta (base leche entera)	16,81-40,13	Línea celular	Cilla y col., 2011
Bebidas de fruta (base leche desnatada)	15,12-32,21	Caco-2	

- **Zinc**

En el caso de la biodisponibilidad *in vitro* del Zn, se observó un mayor valor de dializabilidad en la leche fermentada experimental que en la control, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Aún así, tanto la leche fermentada control como la experimental presentaron una biodisponibilidad *in vitro* superior con respecto a las leches fermentadas comerciales, existiendo diferencias significativas en la fracción soluble y dializada y en el porcentaje de dializabilidad de ambas dos. En el caso de la control, la solubilidad también fue significativamente mayor frente a las comerciales.

Estas observaciones coinciden con los datos aportados en estudios previos de nuestro grupo, en los que se encontró mayor dializabilidad de Zn en una leche de cabra fermentada experimental utilizando como probiótico la cepa *L. fermentum* D3, en comparación con leches fermentadas comerciales (Bergillos-Meca y col., 2013). Aunque el mecanismo mediante el que los microorganismos probióticos pueden favorecer la absorción mineral no está del todo claro, se describió que podría ser debido a que éstos pueden incrementar los niveles de ciertas sustancias que ligan el mineral y lo mantienen en forma soluble.

Los datos obtenidos para este mineral se recogen en las tablas 28 y 29, y su biodisponibilidad se esquematiza en la figura 32.

En lo que respecta a la biodisponibilidad en células Caco-2, se observó un porcentaje de transporte significativamente menor en la leche fermentada control frente a las comerciales. A pesar de ello, la eficiencia del transporte y de la captación, datos que estiman de forma más realista la absorción del mineral, fueron superiores en las leches fermentadas elaboradas experimentalmente, en comparación con las comerciales, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Aunque los valores de la eficiencia de captación de Zn por la línea celular Caco-2 fueron bajos, representando sólo una pequeña proporción de la fracción soluble o bioaccesible, son similares a algunos datos descritos por otros autores. Por ejemplo, Jovaní y col. (2001) determinaron la biodisponibilidad de este mineral en fórmulas a base de leche utilizando células Caco-2 y observaron una biodisponibilidad de 9,02 - 12,62%.

Perales y col. (2006) estudiaron la biodisponibilidad *in vitro* de Zn en fórmulas infantiles; observaron valores de captación que variaron desde 8,8% en fórmulas adaptadas suplementadas con lactato ferroso hasta 47,3% en fórmulas con *Bifidobacterium*.

**Tabla 28.** Concentración de **zinc** en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión *in vitro* de las leches fermentadas (LF).

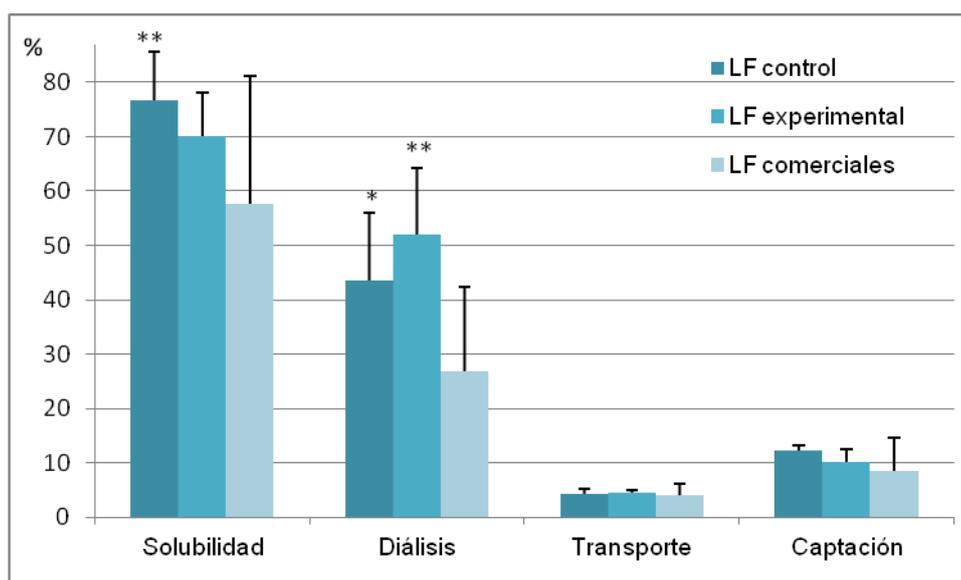
	Fracción soluble (µg/g)	Solubilidad (%)	Fracción dializada (µg/g)	Dializabilidad (%)
<b>LF control</b> (n=10)	4,53±0,50***	76,65±8,89**	2,50±0,73**	43,56±12,54*
<b>LF experimental</b> (n=10)	4,10±0,51**	70,01±8,12	2,65±1,08*	51,99±12,21**
<b>LF comerciales</b> (n=5)	2,86±1,37	57,60±23,57	1,24±0,62	26,88±15,53

Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,01$ .

**Tabla 29.** Retención, transporte y captación de **zinc** en las leches fermentadas (LF) tras los ensayos con células Caco-2.

	Zn añadido (µg)	Retención		Transporte			Captación		
		(µg)	(%)	(µg)	(%)	Eficiencia (%)	(µg)	(%)	Eficiencia (%)
<b>LF control</b> (n=6)	0,79	0,075±0,013	11,30±3,37	0,045±0,008	5,70±1,03*	4,37±0,79	0,13±0,01	16,02±1,27	12,28±0,97
<b>LF experimental</b> (n=6)	0,70	0,041±0,026	9,55±3,45	0,045±0,006	6,38±0,84	4,47±0,59	0,10±0,02	14,38±3,38	10,07±2,37
<b>LF comercial</b> (n=6)	0,51	0,052±0,035	10,99±6,83	0,039±0,004	7,96±1,99	4,11±2,06	0,09±0,04	18,47±7,81	8,44±6,20

Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ .



**Figura 32.** Biodisponibilidad *in vitro* de zinc en las leches fermentadas (LF).

Diferencias estadísticamente significativas frente a LF comerciales. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,01$ .

En la tabla 30 se muestran los datos de biodisponibilidad de Zn *in vitro* en productos lácteos, obtenidos por otros autores.

**Tabla 30.** Biodisponibilidad de zinc en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores.

Tipo de muestra	Biodisponibilidad (%)	Método	Referencia
Derivados lácteos	60,5±15,5	Solubilidad	Cabrera y col., 1996
Fórmulas infantiles	51,8-92,9	Solubilidad	Perales y col., 2006
LF de cabra con <i>L. fermentum</i> D3	41,01±8,44	Dializabilidad	Bergillos-Meca y col., 2013
LF comerciales	29,97±8,05		
Leche humana	48,2±4,1	Dializabilidad	Bosscher y col., 2003
Fórmula infantil	9,3±0,5		
Fórmulas + fibra	7,0-12,2		
Yogur	43,51-46,40	Dializabilidad	Drago y col., 2002
Yogur enriquecido en Fe	38,36-45,99		
Leche acidificada	33,53-34,99		
Leche acidificada enriquecida en Fe	20,81-31,34		

**Tabla 30.** Continuación.

<b>Yogur enriquecido en Fe</b>	38,36-63,02	Dializabilidad	Drago y col., 2008
<b>Fórmulas infantiles</b>	2,2-28,7	Dializabilidad	García y col., 1998
<b>Fórmulas infantiles</b>	9,4-51,7	Dializabilidad	Perales y col., 2006
<b>Fórmulas infantiles a base de leche</b>	8,0-9,7	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2001
<b>Fórmulas infantiles</b>	8	Dializabilidad	Pérez-Llamas y col., 2003
<b>Fórmulas con proteínas hidrolizadas</b>	18		
<b>Fórmulas a base de leche</b>	10,2	Dializabilidad	Shen y col., 1994
<b>Fórmulas a base de leche</b>	9,02-12,62	Línea celular Caco-2	Jovaní y col., 2001
<b>Fórmulas infantiles</b>	8,8-47,3	Línea celular Caco-2	Perales y col., 2006

Perales y col. (2006) observaron que las fracciones solubles presentaron más cantidad de Zn que las dializadas en fórmulas infantiles. Explicaron que, como era de esperar, bajo las condiciones aplicadas en los ensayos de diálisis, sólo los compuestos de Zn más pequeños que el tamaño de poro de la membrana fueron dializados. Estas observaciones coinciden con nuestros resultados, pues la dializabilidad siempre fue menor que la solubilidad no sólo del Zn, sino también en el caso de Ca, Mg y P.

Estos autores observaron una mayor solubilidad, transporte y captación de Zn en fórmulas con mayor contenido en caseína, explicando que los caseinfosfopéptidos resultantes de la hidrólisis de caseína se pueden unir a cationes divalentes como el Zn, formando complejos solubles y aumentando la proporción de Zn biodisponible. De la misma forma, Seiquer y col. (2000) concluyeron que el tratamiento térmico ejerce un efecto negativo en la biodisponibilidad de Zn porque altera la estructura de la caseína, de forma que ésta no forma complejos solubles con dicho mineral y la captación por los enterocitos se ve disminuida.

De la Fuente y col. (2003) explicaron que la distribución de Ca, Mg, P y Zn en leche fermentada es muy distinta que en leche, observando que los elementos asociados con caseína son redistribuidos durante la elaboración. El notable incremento de minerales solubles podría favorecer su absorción.

Se ha descrito que la fermentación de la leche con *S. thermophilus* o *L. bulgaricus* aumentó la biodisponibilidad del Zn en comparación con la leche de partida (Van Dael y col., 1993). Una explicación es que el bajo pH del yogur podría favorecer la unión del Zn soluble a ligandos de bajo peso molecular que facilitan su transporte a través del tracto gastrointestinal, o prevenir la unión de este mineral a sustancias quelantes que disminuirían su absorción (Shen y col., 1995).

La leche de cabra y sus derivados fermentados han presentado mayores valores de biodisponibilidad *in vitro* frente a las de vaca y oveja (Shen y col., 1995; Bergillos-Meca y col., 2013). También se ha observado mayor biodisponibilidad de Zn en leche de cabra frente a leche de vaca en estudios *in vivo* con ratas y lechones, demostrando así que la leche de cabra tiene un importante efecto beneficioso sobre la biodisponibilidad de este mineral (Alfárez y col., 2003; Barrionuevo y col., 2003; Rutherford y col., 2006).

Aunque son necesarias futuras investigaciones, estos datos preliminares parecen demostrar una mayor biodisponibilidad *in vitro* de Ca, Mg, P y Zn en la leche fermentada experimental, en comparación con otras leches de cabra fermentadas comerciales, debido a la concentración de la leche por ultrafiltración y posiblemente a la actividad del probiótico *L. plantarum* C4, que favorece la solubilidad, dializabilidad y captación de algunos de estos minerales.



## 5. CONCLUSIONES





1. El contenido de Ca, P y Zn en la leche fermentada experimental es superior al de las comerciales, ya que el proceso de ultrafiltración concentra la fracción de estos minerales unida a caseínas.
2. Los datos aportados proporcionan información útil sobre la composición mineral de leches de cabra fermentadas, de la que no se dispone en las tablas de composición de alimentos ni en las bases de datos nutricionales.
3. Se observa un incremento en la solubilidad, dializabilidad y captación celular de los minerales estudiados en la leche fermentada experimental frente a las comerciales. Posiblemente debido al pH final del producto y al mayor contenido en caseína, que facilita la generación de péptidos bioactivos. Este último aspecto es objeto de estudio en otra Tesis Doctoral integrada en el proyecto.

### **Conclusions**

1. The level of Ca, P and Zn in the experimental fermented milk is higher than in the commercial ones, as the ultrafiltration process concentrates these minerals fraction associated with caseins.
2. These data provide useful information about mineral composition in fermented goat's milks, which is not available in the composition tables of foodstuffs and in nutritional databases.
3. An increase in solubility, dialyzability and cellular uptake of the studied minerals is observed in the experimental fermented milk, in comparison with the commercial ones. Probably due to the final pH of the product and the major casein level, which favours the generation of bioactive peptides. The latter aspect is studied in another Doctoral Thesis associated to the project.



## 6. BIBLIOGRAFÍA





**A**

Alfárez MJM, López-Aliaga IL, Barrionuevo M, Campos MS. Effect of dietary inclusion of goat milk on the bioavailability of zinc and selenium in rats. *J Dairy Res* 2003, 70(2):181-7.

Alfárez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Díaz J, Barrionuevo M, Ros PB, Campos MS. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropernic anaemia in comparison with cow milk. *Int Dairy J* 2006, 16(7):813-21

Algahtani S, Mohamed LA, Kaddoumi A. Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013, 9(10):1241-54.

Azenha MAGO, Vasconcelos MTSD. Assessment of the Pb and Cu *in vitro* availability in wines by means of speciation procedures. *Food Chem Toxicol* 2000, 38(10):899-912.

**B**

Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Kristensen L, Jensen M, Sørensen SS, Purslow PP, Skibsted LH, Sandström B. Increasing the cooking temperature of meat does not affect nonheme iron absorption from a phytate-rich meal in women. *J Nutr* 2003, 133(1):94-7.

Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 2011, 278:381-6.

Barberá R, Farré R. Bioavailability of Trace Elements - Review. *Food Sci Technol Int* 1992, 32(4):381-99.

Baró L, López-Huertas E, Boza JJ. *Leche y derivados lácteos*. En: Gil A (Ed.) *Tratado de Nutrición*. Tomo II: *Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2010.

Barrionuevo M, López Aliaga I, Alfárez MJ, Mesa E, Nestares T, Campos MS. Beneficial effect of goat milk on bioavailability of copper, zinc and selenium in rats. *J Physiol Biochem* 2003, 59(2):111-8.

Bass JK, Chan GM. Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutrition* 2006, 22(10):1057-66.

Beiseigel JM, Hunt JR, Glahn RP, Welch RM, Menkir A, Maziya-Dixon BB. Iron bioavailability from maize and beans: a comparison of human measurements with Caco-2 cell and algorithm predictions. *Am J Clin Nutr* 2007, 86(2):388-96.

Bender KI, Lutsevich AN, Lutsevich IN. Effect of different factors on absorption of dimedrol, pipolphen and suprastin from the rat small-intestine *in vitro*. *Farmakol Toksikol* 1989, 52(3):66-71.

Bergillos-Meca T, Navarro-Alarcón M, Cabrera-Vique C, Artacho R, Olalla M, Giménez R, Moreno-Montoro M, Ruiz-Bravo A, Lasserrot A, Ruiz-López MD. The probiotic bacterial strain *Lactobacillus fermentum* D3 increases *in vitro* the bioavailability of Ca, P, and Zn in fermented goat milk. *Biol Trace Elem Res* 2013, 151(2):307-14.

Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Van Cauwenbergh R, Deelstra H. Availabilities of calcium, iron, and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition* 2003, 19:641-5.

Brans G. *Design of membrane systems for fractionation of particles suspensions*. Memoria de Tesis Doctoral. Wageningen University, 2006.

Brassart D, Vey E. *Patient Cooperation Treaty* 1998. WO99/02170.

Braun A, Hämmerle S, Suda K, Rothen-Rutishauser B, Günthert M, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H. Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur J Pharm Sci* 2000, 11(2):S51-60.

Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997, 214(3):248-57.

## C

Cabrera C, Lorenzo ML, De Mena C, López MC. Chromium, copper, iron, manganese, selenium and zinc levels in dairy products: *in vitro* study of absorbable fractions. *Int J Food Sci Nutr* 1996, 47:331-9.

Cabrera-Vique C, Bouzas P. Chromium and manganese levels in convenience and fast foods: *in vitro* study of the dializable fraction. *Food Chem* 2009, 117:757-63.

Cabrera-Vique C, Mesías M. Chromium and iron content in duplicate meals at a university residence: daily intake and dialysability. *Br J Nutr* 2011a, 105(10):1546-52.

Cabrera-Vique C, Mesías M, Bouzas PR. Nickel levels in convenience and fast foods: *in vitro* study of the dialyzable fraction. *Sci Total Environ* 2011b, 409(8):1584-8.

Cabrera C, Vicaria JM, Fonollá J, Roca AM. *Leche y preparados lácteos*. Editorial Universidad de Granada. Granada, 2013a.

Cabrera-Vique C, Mesías M. Content and bioaccessibility of aluminium in duplicate diets from Southern Spain. *J Food Sci* 2013b, 78:307-12.

Calatayud M, Devesa V, Virseda JR, Barberá R, Montoro R, Vélez D. Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 2012, 50(8):2696-702.

Cámara F, Amaro MA, Barberá R, Clemente G. Bioaccessibility of minerals in school meals: comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chem* 2005, 92:481-9.

Campos MS, López-Aliaga I, Alférez MJM, Nestares T, Barrionuevo M. Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection. *Brit J Nutr* 2003, 90(1):61-7.

Cashman KD. Prebiotics and calcium bioavailability. *Curr Issues Intest Microbiol* 2003, 4:21-32.

Ceballos LS, Morales ER, Adarve GDT, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compos Anal* 2009, 22(4):322-9.

Cempel M, Nickel G. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. *Pol J Environ Stud* 2006, 15:375-82.

Cifuentes M, Morano AB, Chowdhury HA, Shapses SA. Energy restriction reduces fractional calcium absorption in mature obese and lean rats. *J Nutr* 2002, 132(9):2660-6.

Cilla A, Perales S, Lagarda MJ, Barberá R, Farré R. Iron bioavailability in fortified fruit beverages using ferritin synthesis by Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2008, 56(18):8699-703.

Cilla A, Lagarda MJ, Alegría A, De Ancos B, Cano MP, Sánchez-Moreno C, Plaza L, Barberá R. Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Res Int* 2011, 44:3030-8.

Closa SJ, de Landeta MC, Andérica D, Pighín A, Cufre JA. Mineral nutrient content in cow milk and dairy products in Argentina. *Arch Latinoam Nutr* 2003, 53(3):320-4.

Champagne CP, Green-Johnson J, Raymond Y, Barrette J, Buckley N. Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Res Int* 2009, 42:612-21.

Chian SS, Pan TM. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, 93(3):903-16.

## D

De la Fuente MA, Montes F, Guerrero G, Juárez M. Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yogurts. *Food Chem* 2003, 80:573-8.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP. Comparative effects of glucose-lysine versus glucose-methionine Maillard reaction products consumption: *in vitro* and *in vivo* calcium availability. *Mol Nutr Food Res* 2005, 49(7):679-84.

Delgado-Andrade C, Seiquer I, Navarro MP, Morales FJ. Estimation of hydroxymethylfurfural availability in breakfast cereals. Studies in Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 2008, 46(5):1600-7.

Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Nieto R, Aguilera JF, Navarro MP, Seiquer I. Does the pelleting process affect the nutritive value of a pre-starter diet for suckling piglets? *Ex vivo* studies on mineral absorption. *J Sci Food Agric* 2010, 90(5):898-905.

Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Campos MS. Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferropenic anaemia. *Int Dairy J* 2009, 19:116-21.

Díaz-Castro J, Alférez MJ, López-Aliaga I, Nestares T, Sánchez-Alcover A, Campos MS. Bile composition, plasma lipids and oxidative hepatic damage induced by calcium supplementation; effects of goat or cow milk consumption. *J Dairy Res* 2013, 80(2):246-54.

Drago SR, Valencia ME. Effect of fermentation on iron, zinc, and calcium availability from iron-fortified dairy products. *J Food Sci* 2002, 67(8):3130-4.

Drago SR, Valencia ME. Mineral dialyzability in milk and fermented dairy products fortified with FeNaEDTA. *J Agric Food Chem* 2008, 56:2553-7.

Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* 2001, 73:368S-92S.

## E

Erba D, Ciappellano S, Testolin G. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats. *Nutrition* 2002, 18(9):743-6.

**F**

Fairweather-Tait S, Phillips I, Wortley G, Harvey L, Glahn R. The use of solubility, dialyzability, and Caco-2 cell methods to predict iron bioavailability. *Int J Vit Nutr Res* 2007, 77(3):158-65.

Fairweather-Tait SJ, Minski MJ, Singh J. Non-radioisotopic method for measuring iron absorption from a Gambian meal. *Am J Clin Nutr* 1987; 46 (5):844-8.

FitzGerald RJ. Potential uses of caseinphosphopeptides. *Int Dairy J* 1998, 8:451-7.

Flynn A, Cashman K. *Nutritional aspects of minerals in bovine and human milks*. En: Fox PF (Ed.). *Advanced dairy chemistry, vol. 3. Lactose, water, salts and vitamins*. Chapman and Hall. London, 1997.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977, 59(1):221-6.

Frontela C. *Efecto de la adición de fitasa sobre la biodisponibilidad mineral in vitro en papillas infantiles*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2007.

Frontela C, Scarino ML, Ferruzza S, Ros G, Martínez C. Effect of dephytinization on bioavailability of iron, calcium and zinc from infant cereals assessed in the Caco-2 cell model. *World J Gastroenterol* 2009, 15(16):1977-84.

**G**

Gambelli L, Manzi P, Panli G, Vivanti V, Pizzoferrato L. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy. *Food Chem* 1999, 66:353-8.

García E, Cabrera C, Lorenzo ML, López MC, Sánchez J. Estimation of chromium bioavailability from the diet by an *in vitro* method. *Food Addit Contam.* 2001, 18(7):601-6.

García R, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ. Dialyzability of iron, zinc and copper of different types of infant formulas marketed in Spain. *Biol Trace Elem Res* 1998, 65(1):7-17.

García-Nebot MJ, Alegría A, Barberá R, Clemente G, Romero F. Addition of milk or caseinophosphopeptides to fruit beverages to improve iron bioavailability? *Food Chem* 2010, 119:141-8.

Gastaldi E, Lagaude A, Tarodo B. Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 5.0. *J Food Sci* 1996, 61:59-68.

Gilman J, Cashman KD. The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006, 7(1):1-5.

Gösta M. *Manual de industrias lácteas. Tetra Pak Processing Systems AB*. AMV y Mundi-Prensa Ediciones. Madrid, 2003.

Guéguen L. *La valeur nutritionnelle minérale du lait de chèvre*. En: *Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre*. Les Colloques de l'INRA. Niort, 1997.

Güler Z. Levels of 24 minerals in local milk, its strained yoghurt and salted yoghurt (tuzlu yoghurt). *Small Ruminant Res* 2007, 71(1-3):130-7.

Güler Z, Sanal H. The essential mineral concentration of Torba yogurts and their wheys compared with yogurt made with cows', ewes' and goats' milks. *Int J Food Sci Nutr* 2009, 60(2):153-64.

## **H**

Haag M, Magada ON, Claassen N, Böhmer LH, Kruger MC. Omega-3 fatty acids modulate ATPases involved in duodenal Ca absorption. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003, 68(6):423-9.

Haenlein GFW. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci* 2001, 84(9):2097-115.

Höllriegel V, Rohmuss M, Oeh U, Roth P. Strontium biokinetics in humans: influence of alginate on the uptake of ingested strontium. *Health Phys* 2004, 86(2):193-6.

Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD. Iron-absorption in humans as influenced by bovine-milk proteins. *Am J Clin Nutr* 1989, 49(3):546-52.

## **I**

Inc I. Membrane technology benefits the food processing industry. *Filtr Separat* 2004, 41(8):32-3.

## **J**

Jensen LB, Kollerup G, Quaade F, Sørensen OH. Bone minerals changes in obese women during a moderate weight loss with and without calcium supplementation. *J Bone Miner Res* 2001, 16(1):141-7.

Jovaní M, Barberá R, Farré R, Martín de Aguilera E. Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2001, 49:3480-5.

Jovaní M, Barberá R, Farré R. Effect of lactoferrin addition on the dialysability of iron from infant formulas. *J Trace Elem Med Bio* 2003, 17(2):139-42.

Jovanovic V, Durovic S. Relation between intestinal calcium and strontium absorption. *Coll Antropol* 1994, 18:79-85.

## K

Kruger M, Chua WH, Darragh A, Booth CL, Prosser C, Lowry D. Impact of goat milk powdered formulations on mineral absorption, peak bone mass and bone loss due to ovariectomy in rats. *J Sci Food Agric* 2008, 88:1082-90.

Kruger MC, Fear A, Chua WH, Plimmer GG, Schollum LM. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on mineral absorption and bone health in growing male and ovariectomised female rats. *Dairy Sci Technol* 2009, 89(3-4):219-31.

## L

Laitinen L. *Caco-2 cell cultures in the assessment of intestinal absorption: effects of some co-administered drugs and natural compounds in biological matrices*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Helsinki, 2006.

Laparra JM, Glahn RP, Miller DD. Different responses of Fe transporters in Caco-2/HT29-MTX cocultures than in independent Caco-2 cell cultures. *Cell Biol Int* 2009, 33(9):971-7.

Lin TH, Hu K, Flarakos J, Sharr-McMahon M, Mangold JB, He H, Wang Y. Assessment of the absorption, metabolism and excretion of [<sup>14</sup>C]pasireotide in healthy volunteers using accelerator mass spectrometry. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013, 72(1):181-8.

Liu X, Jia L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and *in vivo* studies. *Curr Drug Metab* 2007, 8(8):815-21.

Liu DZ, Weeks MG, Dunstan DE, Martin GJO. Alterations to the composition of casein micelles and retentate serum during ultrafiltration of skim milk at 10°C and 40°C. *Int Dairy J* 2014, 35:63-9.

Lonnerdal B. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. *Int J Food Sci Tech* 2002, 37(7):749-58.

López F. *Evaluación de la presencia de aluminio en alimentos y bebidas y su repercusión en la ingesta dietaria*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 1998.

López FE, Cabrera C, Lorenzo ML, López MC. Aluminum levels in convenience and fast foods: *in vitro* study of the absorbable fraction. *Sci Total Environ* 2002, 300(1-3):69-79.

López-Aliaga I, Alférez MJM, Barrionuevo M, Nestares T, Sanz-Sampelayo MR, Campos MS. Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal intestine. Beneficial effect of goat milk. *J Dairy Sci* 2003, 86:2958-66.

López-Aliaga I, Díaz J, Nestares T, Alférez MJM, Campos MS. Calcium-supplemented goat milk does not interfere with iron absorption in rats with anaemia induced by dietary iron depletion. *Food Chem* 2009, 113(3):839-41.

López-Aliaga I, Díaz-Castro J, Alférez MJM, Barrionuevo M, Campos MS. A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection. *Dairy Sci Technol* 2010, 90(6):611-622.

## **M**

Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollinsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 2003, 52:827-33.

Martín-Diana AB, Janer C, Peláez C, Requena T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int Dairy J* 2003, 13:827-33.

Martínez C, Ros G, Periago MJ, López G, Ortuno J, Rincón F. Phytic acid in human nutrition. *Food Sci Technol Int* 1996, 2(4):201-9.

McKinnon H, Kruger M, Prosser C, Lowry D. The effect of formulated goats' milk on calcium bioavailability in male growing rats. *J Sci Food Agric* 2010, 90(1):112-6.

Mehaia MA. Chemical composition of camel skim milk concentrated by ultrafiltration. *Int Dairy J* 1996, 6:141-52.

Mesías M. *Importancia de la dieta en la digestibilidad y metabolismo de hierro y calcio en la adolescencia. Influencia del consumo de productos de la reacción de Maillard*. Memoria de Tesis Doctoral. CSIC y Universidad de Granada, 2007.

Mesías M, Seiquer I, Navarro MP. Influence of diets rich in Maillard reaction products on calcium bioavailability. Assays in male adolescents and in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2009, 57(20):9532-8.

Moreno R, Amaro MA, García H, Zurera G. Effects of Manchego-type cheesemaking process on contents of mineral elements. *Food Chem* 1995, 53:435-9.

Moreno LA, Cervera P, Ortega RM, Díaz JJ, Baladia E, Basulto J, Bel S, Iglesia I, López-Sobaler AM, Manera M, Rodríguez E, Santaliestra AM, Babio N, Salas-Salvadó J. Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. *Nutr Hosp* 2013, 28(6):2039-89.

## **N**

Navarro-Alarcón M, Cabrera-Vique C, Ruiz-López MD, Olalla M, Artacho R, Giménez R, Quintana V, Bergillos T. Levels of Se, Zn, Mg and Ca in commercial goat and cow milk fermented products: relationship with their chemical composition and probiotic starter culture. *Food Chem* 2011, 129:1126-31.

## **O**

O'Dell BL. Bioavailability of trace elements. *Nutr Rev* 1984, 42(9):301-8.

Ortega N, Reguant J, Romero MP, Macià A, Motilva MJ. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. *J Agric Food Chem* 2009, 57(13):5743-9.

## **P**

Pantako TO, Passos M, Desrosiers T, Amiot J. Effect of dietary milk proteins on time-dependent variations in plasma Fe, Mg and Zn levels in aorta and portal vein in rats. *Lait* 1992, 72:553-73.

Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res* 2007, 68(1-2):88-113.

Park YW. Comparison of mineral and cholesterol composition of different commercial goat milk products manufactured in USA. *Small Ruminant Res* 2000, 37:115-24.

Perales S, Barberá R, Lagarda MJ, Farré R. Bioavailability of zinc from infant foods by *in vitro* methods (solubility, dialyzability and uptake and transport by Caco-2 cells). *J Sci Food Agr* 2006, 86:971-8.

Perales S, Barberá R, Lagarda MJ, Farré R. Availability of iron from milkbased formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by *in vitro* methods (solubility, dialysability) and uptake and transport by Caco-2 cells. *Food Chem* 2007, 102(4):1296-303.

Pérez A, Lorenzo ML, Cabrera C, López MC. Influence of enrichment with vitamins and minerals on the bioavailability of iron in cows' milk. *J Dairy Res* 2002, 69(3):473-81.

Pérez-Conesa D, Lopez G, Abellan P, Ros G (2006) Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and symbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters. *J Sci Food Agric* 2006, 86:2337-46.

Pérez-Llamas F, Larqué E, Marín JF, Zamora S. *In vitro* availability of minerals in infant foods with different protein source. *Nutr Hosp* 2001, 16(5):157-61.

Pérez-Llamas F, Marín JF, Larqué E, Garaulet M, Zamora S. Effect of protein hydrolysis on the dialysability of amino acids and minerals in infant formulas. *J Physiol Biochem* 2003, 59(1):19-24.

Premaratne RJ, Cousin MA. Changes in the chemical composition during ultrafiltration of skim milk. *J Dairy Sci* 1991, 74(3):788-95.

## Q

Quintana V. *Caracterización fisicoquímica y nutricional de leches fermentadas de cabra*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2011.

## R

Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y. Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Ruminant Res* 2008, 79:57-72.

Rekha CR, Vijayalakshmi G. Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast. *J Appl Microbiol* 2010, 109(4):1198-208.

Remeuf F. Influence of genetic-polymorphism of caprine alpha(s1)-casein on physicochemical and technological properties of goats milk. *Lait* 1993, 73(5-6):549-57.

Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Bergillos-Meca T, Tabatabaee S, George TW, Heiss C, Spencer JP. Intake and time dependence of blueberry flavonoid-induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity. *Am J Clin Nutr* 2013, 98(5):1179-91.

Roig MJ, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ. Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. *Food Chem* 1999, 64:403-9.

Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C, Alonso-Olalla R, Navarro MP. Influence of bread crust-derived Maillard reaction products on phosphorus balance in rats. *Eur J Nutr* 2012, 51(7):871-9.

Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C, Haro A, Ruiz-Roca B, Morales FJ, Navarro MP. Effects of dietary bread crust Maillard reaction products on calcium and bone metabolism in rats. *Amino Acids* 2013, 44(6):1409-18.

Rosado JL, Díaz M, González K, Griffin I, Abrams SA, Preciado R. The addition of milk or yogurt to a plant-based diet increases zinc bioavailability but does not affect iron bioavailability in women. *J Nutr* 2005, 135(3):465-8.

Rutherford SM, Darragh AJ, Hendriks WH, Prosser CG, Lowry D. Mineral retention in three-week-old piglets fed goat and cow milk infant formulas. *J Dairy Sci* 2006, 89(12):4520-6.

## S

Sambuy Y, DeAngelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005, 21:1-26.

Schlemmer U. Bioavailability of nutrients. Conceptual aspects of definition and problems of determination. *Br J Nutr* 1995, 73(1):150-1.

Schmitt M, Saulnier F, Malhautier L, Linden G. Effect of temperature on the salt balance of milk studied by capillary ion electrophoresis. *J Chromatogr* 1992, 640:419-24.

Schwab D, Portron A, Backholer Z, Lausecker B, Kawashima K. A novel double-tracer technique to characterize absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of [<sup>14</sup>C]tofogliflozin after oral administration and concomitant intravenous microdose administration of [<sup>13</sup>C]tofogliflozin in humans. *Clin Pharmacokinet* 2013, 52(6):463-73.

Seiquer I, Valverde A, Delgado-Andrade C, Navarro MP. Influence of heat treatment of casein in presence of reducing sugars on Zn solubility and Zn uptake by Caco-2 cells after *in vitro* digestion. *J Physiol Biochem* 2000, 56(3):237-46.

Seiquer I, Delgado-Andrade C, Haro A, Navarro MP. Assessing the effects of severe heat treatment of milk on calcium bioavailability: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Dairy Sci* 2010, 93:5635-43.

Shen L, Luten J, Robberecht H, Bindels J, Deelstra H. Modification of an *in vitro* method for estimating the bioavailability of zinc and calcium from foods. *Z Lebensm Unters Forsch* 1994, 199:442-5.

Shen L, Robberecht H, Van Dael P, Deelstra H. Estimation of the bioavailability of zinc and calcium from human, cow's, goat, and sheep milk by an *in vitro* method. *Biol Trace Elem Res* 1995, 49(2-3):107-18.

Slacanac V, Bozanic R, Hardi J, Szabo JR, Lucan M, Krstanovic V. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int J Dairy Technol* 2010, 63(2):171-89.

## T

Tako E, Hoekenga OA, Kochian LV, Glahn RP. High bioavailability iron maize (*Zea mays* L.) developed through molecular breeding provides more absorbable iron *in vitro* (Caco-2 model) and *in vivo* (*Gallus gallus*). *Nutr J* 2013, 12(3):1-11.

Tetens I, Larsen TM, Kristensen MB, Hels O, Jensen M, Morberg CM, Thomsen AD, Højgaard L, Henriksen M. The importance of dietary composition for efficacy of iron absorption measured in a whole diet that includes rye bread fortified with ferrous fumarate: a radioisotope study in young women. *Br J Nutr* 2005, 94(5):720-6.

Tolosa S, Bullón J, Cárdenas A. Producción de yogur utilizando membranas cerámicas para incrementar el porcentaje de sólidos en la leche. *Revista Ciencia e Ingeniería* 2006, 27:1-9.

Troesch B, Jing H, Laillou A, Fowler A. Absorption studies show that phytase from *Aspergillus niger* significantly increases iron and zinc bioavailability from phytate-rich foods. *Food Nutr Bull* 2013, 34(2):S90-101.

Turco L, Catone T, Caloni F, Di Consiglio E, Testai E, Stamatii A. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this *in vitro* model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol In Vitro* 2011, 25(1):13-20.

Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol* 2010, 143:87-102.

## U

Ungell AL, Karlsson J. *Cell culture in drug discovery: an industrial perspective*. En: Van de Waterbeem H, Lennernäs H, Artursson P (Ed.) *Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, 2004.

**V**

Van Campen DR, Glahn RP. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crop Res* 1999, 60(1-2):93-113.

Van Dael P, Shen LH, Deelstra H. *Influence of milk processing on the in vitro availability of zinc and selenium from milk*. En: *Bioavailability'93-nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability*. Nutrient-Bioavailability Symposium (Part I). Belgium, 1993.

Velasco-Reynold C, Navarro-Alarcón M, López-García de la Serrana H, Pérez-Valero V, López-Martínez MC. Total and dialyzable levels of manganese from duplicate meals and influence of other nutrients: estimation of daily dietary intake. *Food Chem* 2008a, 109:113-21.

Velasco-Reynold C, Navarro M, López H, Pérez V, López MC. *In vitro* determination of zinc dialysability from duplicate hospital meals: influence of other nutrients. *Nutrition* 2008b, 24:84-93.

Velasco-Reynold C, Navarro M, García H, Pérez V, López MC. Iron dialyzability from hospital duplicate meals: daily intake. *Biol Trace Elem Res* 2009, 130(3):241-8.

Velasco-Reynold C, Navarro-Alarcón M, López-García de la Serrana H, Pérez-Valero V, Agil A, López-Martínez MC. Dialysability of magnesium and calcium from hospital duplicate meals: influence exerted by other elements. *Biol Trace Elem Res* 2010, 133:313-24.

Viadel B, Barberá R, Farré R. Uptake and retention of calcium, iron, and zinc from raw legumes and the effect of cooking on lentils in Caco-2 cells. *Nutr Res* 2006, 26:591-6.

Vitali D, Dragojevic IV, Sebecic B. Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from whole grain tea-biscuits: impact of proteins, phytic acid and polyphenols. *Food Chem* 2008, 110(1):62-8.

Volpe DA. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci* 2008, 97(2):712-25.

Vyas HK, Tong PS. Process for calcium retention during skim milk ultrafiltration. *J Dairy Sci* 2003, 86(9):2761-6.

**W**

Wang H, Hu P, Jiang J. Calcium bioavailability of calcium L-threonate in healthy Chinese subjects measured with stable isotopes ( $^{44}\text{Ca}$  and  $^{42}\text{Ca}$ ). *Eur J Clin Pharmacol* 2013, 69(5):1121-6.

Wang YD, Wang X, Wong YS. Generation of selenium-enriched rice with enhanced grain yield, selenium content and bioavailability through fertilisation with selenite. *Food Chem* 2013b, 1:141(3):2385-93.

**Y**

Yu H, Cook TJ, Sinko PJ. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res* 1997, 14(6):757-62.

**Z**

Zhang L, Lin G, Kovács B, Jani M, Krajcsi P, Zuo Z. Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein. *Eur J Pharm Sci* 2007, 31(3-4):221-31.

# CAPÍTULO III

Efectos protector y regenerador de *Lactobacillus plantarum* C4 sobre la barrera de permeabilidad intestinal *in vitro*





# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	205
1.1. Barrera intestinal .....	207
1.2. Enfermedad inflamatoria intestinal .....	208
1.3. Probióticos .....	211
• Interacción de <i>Lactobacillus</i> con el epitelio .....	212
• Actividad antiinflamatoria de <i>Lactobacillus</i> .....	213
• <i>Lactobacillus</i> en el tracto gastrointestinal.....	214
• Efecto de <i>Lactobacillus</i> en enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable y cáncer de colon .....	215
1.4. Evaluación de la permeabilidad de la barrera intestinal.....	216
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	219
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	223
3.1. Instrumentación.....	225
3.2. Reactivos y disoluciones .....	226
3.3. Preparación de la bacteria.....	228
3.4. Cultivos celulares .....	229
• Ensayos de viabilidad celular .....	229
• Ensayos de actividad metabólica celular.....	229
• Siembra de las células Caco-2 en placas bicamerales.....	230
3.5. Ensayos de protección y regeneración.....	231
3.6. Estudio estadístico .....	234
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	235
4.1. Cultivos celulares .....	237
• Ensayos de viabilidad y actividad metabólica celular .....	237
• Integridad y confluencia de la monocapa .....	239
4.2. Ensayos de protección y regeneración.....	240
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	249
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	253



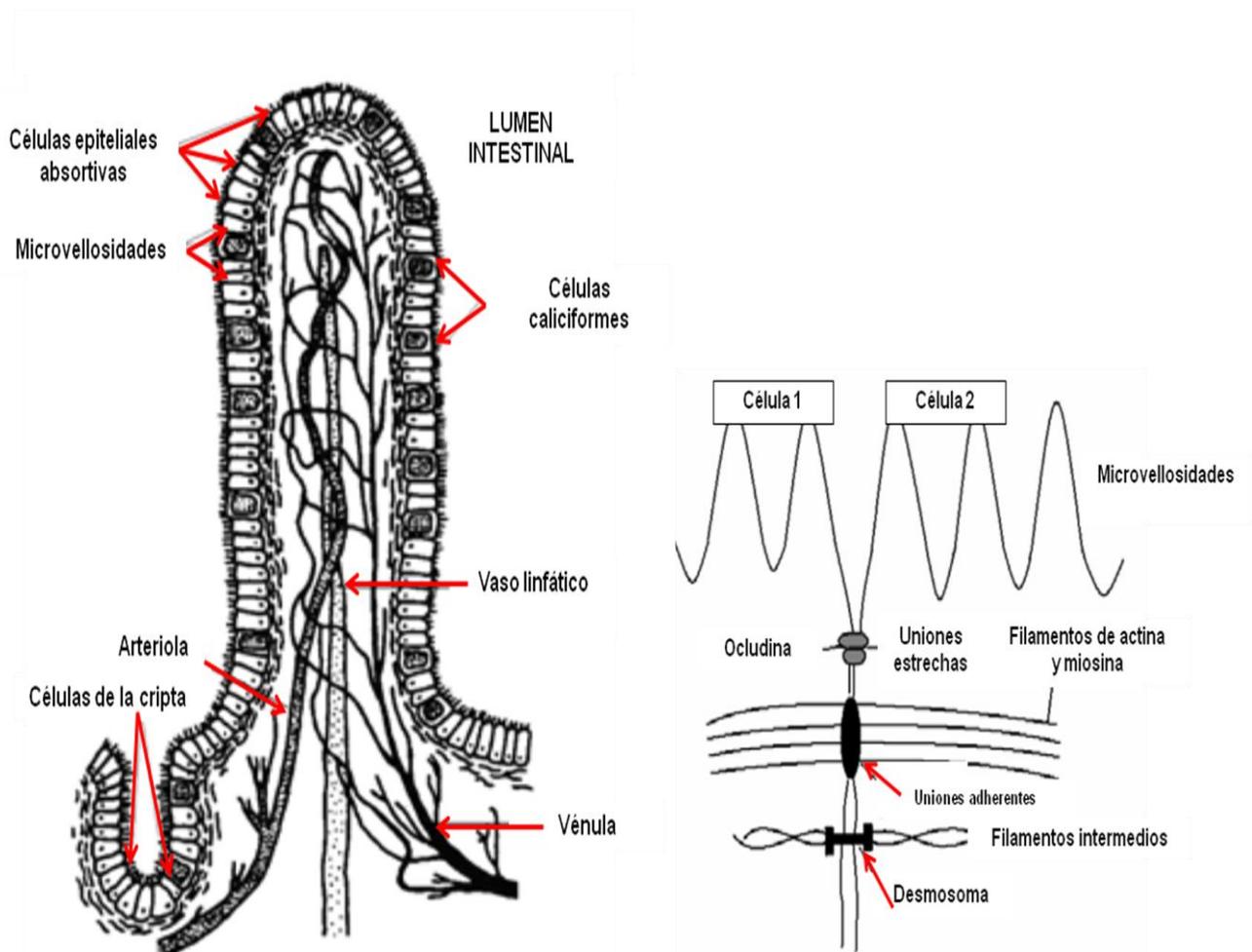
# 1. INTRODUCCIÓN





### 1.1. Barrera intestinal

La mucosa intestinal consiste en una capa de células epiteliales que representa la principal barrera para la absorción de nutrientes, fármacos y, en general, moléculas presentes en la luz intestinal. El epitelio intestinal está compuesto por diferentes tipos de células formando vellosidades, siendo las más abundantes los enterocitos o células epiteliales absortivas. Éstas se forman en las criptas y se diferencian durante la migración hacia la parte superior de las vellosidades en un período de tres a cinco días. Durante la diferenciación, las células adoptan una apariencia columnar, desarrollan microvellosidades en sus superficies apicales y forman uniones estrechas con las células vecinas. Cuando los enterocitos diferenciados alcanzan la cumbre de las vellosidades, se desprenden en el lumen intestinal. Además, en las vellosidades existen células caliciformes (productoras de mucina) y células-M en las placas de Peyer (figura 33) (Laitinen, 2006; Frontela, 2007).



**Figura 33.** Estructura de una vellosidad intestinal y complejo de unión entre células epiteliales.

Todas estas células forman una barrera de protección a través de diferentes uniones intercelulares. Dichas uniones se componen de distintas estructuras; desmosomas que unen las células por filamentos intermedios, uniones adherentes que mantienen las células adyacentes juntas mediante moléculas de adhesión dependientes de calcio unidas a filamentos de actina y miosina, y uniones estrechas (figura 33). Estas últimas, que son los componentes más apicales del complejo de unión, son estructuras complejas que constan de proteínas transmembrana, y son responsables de la integridad y permeabilidad del epitelio (Ulluwishewa y col., 2011).

Todas estas células no son únicamente responsables del transporte de nutrientes, sino que hacen del epitelio intestinal una barrera defensiva contra los contenidos intestinales y el medio ambiente en general, permitiendo la entrada de determinadas moléculas para la nutrición del organismo y programando el sistema inmune de la mucosa, pero excluyendo a la vez toxinas y gran parte de microorganismos. Por tanto, una barrera epitelial intestinal intacta es esencial para prevenir la penetración de antígenos lumenales.

Dicho epitelio es constantemente renovado por nuevas células provenientes de células madre, este proceso de renovación dura de cinco a siete días y permite a las células epiteliales funcionar con gran eficiencia metabólica. Sin embargo, esta renovación celular supone un reto para la barrera intestinal. Es bien conocido que la alteración de este sistema de defensa de la barrera, manifestada por un aumento en la permeabilidad intestinal, juega un importante papel en la patogénesis de ciertas enfermedades del intestino de naturaleza inmunitaria, como enfermedades inflamatorias intestinales crónicas y fallos en múltiples órganos, así como también de cáncer de colon (Frontela y col., 2010; Watson y col., 2012).

### **1.2. Enfermedad inflamatoria intestinal**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende un grupo heterogéneo de enfermedades crónicas. Las más conocidas son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. El cuadro sintomático común comprende dolor abdominal, diarrea, obstrucción intestinal, calambres abdominales, fiebre, heces sanguinolentas o pérdida de peso, y se asocia frecuentemente a otros procesos como artritis y complicaciones obstétricas. En la colitis ulcerosa, la respuesta inflamatoria está confinada en la mucosa y submucosa del colon, mientras que la enfermedad de Crohn afecta a todo el espesor de la pared del tubo digestivo, desde la mucosa a la serosa y puede estar afectada cualquier porción del tracto gastrointestinal, si bien las

localizaciones más habituales son el íleon terminal y diversos segmentos del colon (Cabré y col., 2010).

La incidencia de la EII ha aumentado en los últimos años, afectando del 3 al 15% de la población y las causas son multifactoriales, incluyendo trastornos inmunes y predisposición genética (Cremonini y col., 2005; Frontela y col., 2010).

Los procesos inflamatorios son respuestas fisiológicas a varios estímulos como agentes extraños, infecciones o lesiones, para ayudar a restablecer la homeostasis. Una continua activación o un fallo en la regulación de dicha respuesta pueden resultar en una inflamación crónica con consecuencias patológicas (Davies y col., 1997; Fiocchi, 2003).

Concretamente a nivel intestinal, el fallo es el resultado de la disfunción epitelial, de respuestas inmunes frente a microbiota entérica y de alteraciones de la homeostasis en respuesta a genes y/o medioambiente (Ferguson y col., 2007; Yapali y col., 2007).

Esta disfunción está principalmente caracterizada por la infiltración de células inflamatorias en la mucosa intestinal, donde la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) va acompañada de la expresión de un amplio espectro de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación asociados con la desregulación inmune (Conner y col., 1996). Los niveles de estos mediadores amplifican la respuesta inflamatoria siendo destructivos y contribuyendo a síntomas clínicos, lo que puede derivar en EII (Duchmann y col., 1995; Romier y col., 2009; Frontela-Saseta y col., 2013).

Por tanto, aunque la etiología no es bien conocida, la hipótesis patogénica más aceptada para la EII sugiere que esta enfermedad es el resultado de una respuesta inflamatoria anómala, exagerada y sostenida frente a estímulos ambientales (muy probablemente la microbiota saprofita intestinal, agentes microbianos patógenos y/o antígenos alimentarios) en individuos genéticamente predispuestos.

Dicha respuesta cursa con un incremento de mediadores de la inflamación (citoquinas, eicosanoides, etc), que son los responsables de las manifestaciones clínicas. El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) es una de las citoquinas centrales en la patogénesis de la inflamación de la mucosa en la EII, por lo que ha sido el objetivo principal de las terapias biológicas y su bloqueo ha llevado a grandes avances en el tratamiento de la EII (Yapali y col., 2007).

Tras diversas investigaciones, se ha demostrado que el aumento en la permeabilidad del epitelio intestinal tiene un importante papel en la fisiopatología de estos desórdenes intestinales.

En la EII, una permeabilidad alterada aumenta la infiltración de estímulos proinflamatorios a las células inmunes subyacentes, lo que provoca cambios en las uniones intercelulares inducidos por citoquinas, llevando a una disfunción e inflamación de la barrera intestinal. En el caso de la enfermedad de Crohn, los pacientes tienen una permeabilidad intestinal anormalmente aumentada, y la pérdida en las uniones intercelulares ha sido propuesta como uno de los principales factores etiológicos de la enfermedad. Además, la permeabilidad del epitelio intestinal está también asociada con diabetes, celiaquía, diarrea en pacientes infectados con VIH, eczema atópico y sensibilidad a ciertos alérgenos de los alimentos, y se observa también en las primeras etapas del desarrollo de cáncer de colon en ratones (Ma y col., 2004b; Karczewski y col., 2010).

Por tanto, la modulación de la permeabilidad epitelial es un objetivo más que relevante a estudiar para el diseño de nuevos tratamientos preventivos o terapéuticos contra este tipo de enfermedades.

En cuanto al tratamiento antiinflamatorio, éste incluye varios fármacos, frecuentemente asociados con efectos secundarios indeseados (Waldner y col., 2009). Por tanto, en la actualidad se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevos agentes que combinen eficacia con pocos efectos adversos, para conseguir una mejora en la calidad de vida del enfermo, como factores dietéticos o nutricionales con capacidad de contribuir a la prevención o incluso tratamiento de los procesos inflamatorios (Romier-Crouzet y col., 2009; Sergent y col., 2010, Frontela-Saseta y col., 2013).

La desnutrición proteicoenergética y las alteraciones del estado nutricional de diversos micronutrientes son complicaciones relevantes que pueden condicionar la evolución clínica de estos pacientes (Cabré y col., 2010).

Una de las principales acciones a llevar a cabo es modificar la dieta habitual del individuo, ya que se ha comprobado que existen ciertos componentes de la misma que mejoran la sintomatología de la enfermedad, mientras que hay otros que conducen a un empeoramiento del cuadro clínico. Recientemente se ha indicado que el consumo de ciertos probióticos puede ayudar en el tratamiento de la EII (Anderson y col., 2010; Donato y col., 2010; Eun y col., 2011; Frontela y col., 2010).

### 1.3. Probióticos

Los probióticos, definidos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (FAO/WHO, 2002), tienen un gran número de efectos beneficiosos en humanos y animales, incluyendo la estimulación del sistema inmune, aumento de la biodisponibilidad de nutrientes, prevención de la adherencia y establecimiento de enteropatógenos, y restauración de la microbiota alterada (Chian et al., 2012; Bergillos-Meca et al., 2013).

El concepto de probiótico no es nuevo, sin embargo, el requerimiento de que la bacteria esté intacta y viva a su paso por el tracto gastrointestinal (GI) podría ser muy restrictivo, pues recientes investigaciones sugieren que ciertos constituyentes de las mismas, como ADN o bacteriocinas, dan cuenta de algunos efectos antiinflamatorios de los probióticos (Isolauri y col., 2004).

Actualmente, hay un considerable interés en la relativa eficacia del uso de cepas individuales de probióticos, así como mezclas de diferentes géneros y especies (Chapman et al., 2012). La mayoría de los probióticos pertenecen al género *Lactobacillus*, al que se le atribuyen diversos beneficios para la salud. Su utilización se remonta a principios del siglo XX (Nissle, 1925; Rettger y col., 1936) y tienen una larga y segura historia en la elaboración de los productos lácteos (Vaughan et al., 1999; Masco et al., 2005).

Aunque los lactobacilos han sido usados por los humanos para diversos propósitos como fermentación de productos vegetales, lácteos y cárnicos, en los últimos años la habilidad de éstos para conferir beneficios para la salud ha sido de mayor interés.

Como se detalla en el Capítulo I del presente trabajo, tanto desde el punto de vista terapéutico como nutricional, el desarrollo de leches fermentadas de cabra con probióticos ha sido recomendado en el campo de la producción de fermentados lácteos (Martín-Diana y col., 2003). Estos productos podrían proporcionar diversos beneficios citados anteriormente, entre los que destacan la prevención y/o mejora de la EII.

Para llevar a cabo investigaciones que permitan avanzar en el campo de la alimentación con probióticos y en especial con lactobacilos, es imprescindible conocer y entender los mecanismos de acción de los mismos, así como las interacciones con el hospedador.

• **Interacción de *Lactobacillus* con el epitelio**

Las interacciones entre los lactobacilos y el hospedador envuelven una alteración de la expresión génica en el epitelio intestinal y las células inmunitarias, con la subsecuente modulación de la función inmune de la mucosa y sistémica. Los efectos de los lactobacilos son dependientes de la concentración, especie y cepa, y estas bacterias son críticas para establecer una homeostasis inmunológica en el hospedador.

Los efectos beneficiosos ejercidos por los lactobacilos en el tratamiento de enfermedades pueden ser ampliamente clasificados como aquellos efectos que aparecen debido a la actividad en el intestino grueso y están relacionados con colonización o inhibición del crecimiento de patógenos, y aquellos efectos que aparecen tanto en el intestino delgado como en el grueso, y están relacionados con una mejora en la respuesta inmune y en la función de la barrera intestinal.

Gracias a diferentes modelos experimentales se ha demostrado que las cepas de *Lactobacillus* difieren en sus mecanismos de acción, y que un simple mecanismo de acción no es responsable de sus efectos clínicos.

Si nos centramos en los efectos sobre la barrera epitelial, los lactobacilos estimulan diversas respuestas de las células que la componen, incluyendo la mejora de la función de barrera (Madsen y col., 2001; Resta-Lenert y col., 2006), síntesis y secreción de mucina (Mack y col., 2003; Otte y col., 2004) y supervivencia celular (Yan y col., 2002). En cuanto a la barrera intestinal, los lactobacilos pueden influir sobre ella a través de las uniones estrechas. Por ejemplo, Madsen y col. (2001) mostraron que una combinación de probióticos, que contenía *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, era efectiva para mejorar la función de la barrera tanto *in vitro* con cultivos celulares, como *in vivo*. Además, encontraron que algunos factores bioactivos secretados por las cepas incluidas en la mezcla eran efectivos previniendo la invasión de *Salmonella* en células epiteliales.

Los lactobacilos también modulan la liberación de citoquinas de células epiteliales dependiendo de la dosis y la cepa. Así, otros investigadores han estudiado la capacidad de distintas cepas de *Lactobacillus* de atenuar la secreción de citoquinas inflamatorias inducida por TNF- $\alpha$  en células Caco-2, destacando que la dosis correcta es crítica para un uso terapéutico exitoso (Ma y col., 2004a; Zhang y col., 2005; Nemeth y col., 2006).

Existe una creciente evidencia científica de que la utilidad de los probióticos se ha extendido no sólo a enfermedades intestinales, sino que sus efectos extra-intestinales inducidos por administración oral o sistémica han sido demostrados con éxito en enfermedades crónicas del hígado, síndrome de disfunción orgánica múltiple y enfermedad autoinmune (Loguercio y col., 2005; Alberda y col., 2007; Matsuzaki, 2007).

Debido a que las interacciones de *Lactobacillus* con el sistema inmune dependen de la especie y concentración de la bacteria y del compartimento inmunológico estudiado, son necesarios futuros estudios que caractericen cuidadosamente las distintas poblaciones y concentraciones de bacterias específicas en el hospedador, tanto enfermo como sano.

#### • Actividad antiinflamatoria de *Lactobacillus*

La actividad antiinflamatoria de los lactobacilos es un punto importante a destacar, pues se ha descrito que existe una estrecha relación entre inflamación crónica y cáncer (Balkwill y col., 2001; Coussens y col., 2002; Aggarwal y col., 2006).

Se ha demostrado que un incremento excesivo en la respuesta de células T como TNF- $\alpha$  e interleuquina-1 (IL-1) en tejidos favorece el desarrollo y crecimiento de tumores, y que la desregulación de estas respuestas resulta en inflamación intestinal crónica y en un mayor riesgo de cáncer de colon. Así, los individuos con EII tienen un riesgo incrementado de desarrollar neoplasias en el colon (Campbell y col., 2001; Vagefi y col., 2005).

Se ha observado que diferentes cepas de lactobacilos tienen efectos anticancerígenos mediados por una disminución en la secreción de citoquinas proinflamatorias, que suponen una menor inflamación del colon y un menor desarrollo de tumores. Estos resultados indican que la regulación de la respuesta inflamatoria por probióticos está asociada con un reducido riesgo de varios carcinomas (O'Mahony y col., 2001). Aun así, Riedel y col. (2006) realizaron un ensayo produciendo inflamación con TNF- $\alpha$  y lipopolisacáridos (LPS) y mostraron que los efectos de las distintas cepas pueden ser específicos dependiendo del agente causante de la inflamación.

Por otro lado, se ha visto que *Lactobacillus rhamnosus* GG previene la apoptosis celular inducida por citoquinas en ratones y humanos, y puede favorecer la recuperación del epitelio tras un daño agudo (Yan y col., 2002).

Aunque los probióticos parecen ser beneficiosos con respecto al cáncer y proliferación celular, se requiere un mayor estudio de los mecanismos de acción, así como una identificación de cepas con características deseables. Es imprescindible evaluar los efectos a largo plazo en la inmunidad del hospedador. El continuo desarrollo de técnicas celulares y moleculares podría llevar a un mejor entendimiento de estos mecanismos de probiosis, y a la prevención y/o tratamiento del cáncer con bacterias beneficiosas.

- ***Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal**

Los lactobacilos son parte de la microbiota normal del tracto GI de humanos y muchos animales, y se encuentran en menor proporción en los tractos genital y respiratorio. Históricamente, se ha pensado en la microbiota comensal del tracto GI como algo benigno, pero los experimentos en tiempos más recientes usando modelos animales libres de gérmenes ha mostrado que la microbiota normal tiene profundos efectos en la fisiología e inmunología del hospedador (Xu y col., 2003; Backhed y col., 2004; Mazmanian y col., 2005).

Tras el nacimiento, el tracto GI de los vertebrados es estéril, pero es rápidamente colonizado por bacterias y en los primeros meses de vida la microbiota intestinal cambia y aumenta en diversidad. La capacidad bioquímica de los microorganismos, el microambiente determinado por las células del hospedador y los alimentos disponibles determinarán qué bacterias se convertirán en colonizadoras a largo plazo (Kassen y col., 2004; Backhed y col., 2005). En el adulto, los organismos que habitan en el tracto GI son extremadamente estables y es muy difícil introducir nuevas especies (Vanhoutte y col., 2006).

Como parte de esta microbiota, se ha estimado que el número de lactobacilos se sitúa entre  $10^3$ - $10^6$  bacterias/mL en la cavidad oral,  $10^3$  bacterias/mL en el estómago y  $10^4$  bacterias/mL en dueno y yeyuno. Este número aumenta hasta  $10^8$  bacterias/mL en el íleon y  $10^9$  bacterias/mL en el colon (Walter, 2005).

Las funciones de la microbiota intestinal son muy numerosas, incluyendo interacción competitiva con patógenos, reducción en la translocación bacteriana, producción de compuestos antimicrobianos y señalización antiinflamatoria.

- **Efecto de *Lactobacillus* en enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable y cáncer de colon**

Como se cita anteriormente, la etiología de la **EII** es compleja, pero el consenso es que se debe a una respuesta inmune exagerada a microbiota entérica en individuos genéticamente susceptibles (Elson, 2000; Shanahan, 2000). Mientras no existe una cura médica para la EII, terapias como fármacos antiinflamatorios, esteroideos y anti-TNF- $\alpha$ , pueden reducir los signos y síntomas e incluso llevar a una remisión a largo plazo (Hanauer, 2001; Monteleone y col., 2005).

Existe una gran evidencia de que la microbiota entérica es un componente clave en el proceso inflamatorio de la EII, lo que ha llevado a un aumento en el interés de la modificación terapéutica de la microbiota entérica con probióticos y en particular con cepas de *Lactobacillus* en el tratamiento de estos pacientes.

En el caso de la enfermedad de Crohn, se han llevado a cabo diversos estudios incluyendo lactobacilos para el tratamiento, pero los resultados son variables y no concluyentes, debido probablemente a que son estudios a pequeña escala. Entre ellos, se ha observado que *L. rhamnosus* GG mejora la permeabilidad intestinal en niños con dicha enfermedad (Gupta y col., 2000).

Con respecto a la colitis ulcerosa, se ha demostrado la eficacia de ciertas cepas de lactobacilos así como de una combinación de probióticos en la remisión de la enfermedad. Además, se confirmó la existencia de los mismos en los cultivos fecales (Venturi y col., 1999; Bibiloni y col., 2005; Zocco y col., 2006).

El uso y eficacia de probióticos en la EII se confirma gracias a estos y otros estudios. Sin embargo, serían necesarias más investigaciones para clarificar cuestiones como las cepas, las dosis, los tipos de pacientes y si el uso de los probióticos debería ser anterior al uso de antibióticos.

El **síndrome de intestino irritable** (SII) es el diagnóstico más frecuente de los gastroenterólogos. Su etiología es desconocida pero uno de los mecanismos supuestos es una perturbación de la microbiota intestinal. Esto ha llevado también a un mayor interés en la manipulación terapéutica de la microbiota con varias cepas probióticas, especialmente lactobacilos.

Se ha demostrado una mejora del 50% de la función GI en pacientes con SII a los que se les administró *Lactobacillus acidophilus*, frente a aquellos tratados con placebo (Halpern y col., 1996). También se han llevado a cabo diversos estudios con

cepas de *Lactobacillus plantarum*, obteniéndose resultados variables; algunos estudios demostraron una disminución en dolor abdominal, flatulencia y síntomas generales con el probiótico (Nobaek y col., 2000; Niedzielin y col., 2001), mientras que en otros no se observaron beneficios en los síntomas (O'Sullivan y col., 2000; Sen y col., 2002).

Es por ello que el uso de probióticos en SII debe ser evaluado y validado con ensayos aleatorizados y controlados con placebo más amplios, con mayor duración del tratamiento y con un perfil de paciente mejor definido.

El **cáncer de colon** es la segunda causa de muerte por cáncer y no disminuye su incidencia, a pesar de las nuevas herramientas y pruebas genéticas para su diagnóstico. La gran mayoría de casos son de tipo esporádico y se piensa que la dieta es un factor contribuyente en su etiología.

Diversos estudios con animales han mostrado la habilidad de varias cepas de *Lactobacillus* en la reducción de tumores de colon (Keohane y col., 2009). Indudablemente, el uso de bacterias ácido-lácticas como un posible anticancerígeno podría ser revolucionario, pero necesita una mayor validación.

#### **1.4. Evaluación de la permeabilidad de la barrera intestinal**

En base a lo expuesto, queda claro que los efectos inmunomoduladores de los probióticos resultan una promesa para el tratamiento de la EII, pero los mecanismos envueltos no son bien conocidos aún. Para mejorar las condiciones de vida de los pacientes, las investigaciones con probióticos se centran en sus propiedades antiinflamatorias, así como en la inhibición de citoquinas proinflamatorias (Quigley, 2007).

Se han descrito tres mecanismos mediante los cuales estos microorganismos beneficiosos protegen de la inflamación intestinal: excluir o inhibir el crecimiento de ciertos patógenos, modular la respuesta del sistema inmune o de otras funciones metabólicas, y mejorar la función de la barrera intestinal (Zakostelska y col., 2011).

El uso de probióticos para regular la función de la barrera intestinal en enfermedades relacionadas con la inflamación ha sido propuesto como un potencial tratamiento terapéutico (Vanderpool y col., 2008). Apoyando esta hipótesis, diversos autores han concluido que ciertos probióticos mejoran la permeabilidad intestinal y refuerzan la función de la barrera, tras observar un incremento en la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) *in vitro* en células tanto sanas como dañadas (Anderson y col.,

2010; Chen y col., 2012). En base a estos resultados, Chen y col. (2012) concluyeron que *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 puede ser aplicado en leches fermentadas como una alternativa para desórdenes intestinales.

Para llevar a cabo una evaluación del efecto protector y/o regenerador de los probióticos sobre la permeabilidad de la barrera intestinal, se han empleado líneas celulares dañadas por diversos agentes. Se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  incrementa la permeabilidad intestinal y que en pacientes con enfermedad de Crohn los niveles del mismo son altos, por lo que éste podría ser un importante factor en el incremento anormal de permeabilidad que caracteriza dicha enfermedad. Ma y col. (2004b) estudiaron los mecanismos envueltos en la modulación del TNF- $\alpha$  y permeabilidad del epitelio intestinal usando monocapas de células Caco-2.

Diversos autores sugirieron que la bilirrubina no conjugada (UCB) incrementaba la permeabilidad del epitelio intestinal en modelos *in vitro*, pues observaron una menor TEER en células Caco-2, aunque el efecto podía ser reversible (Raimondi y col., 2006; Zhou y col., 2010). Zhou y col. (2010) estudiaron los efectos de diversas cepas de probióticos sobre la permeabilidad del epitelio intestinal empleando cultivos celulares dañados con UCB.

Por otro lado, el efecto de una cepa de *L. plantarum* sobre la función de la barrera intestinal fue estudiado en células Caco-2, midiendo la TEER de las monocapas celulares y concluyendo que el microorganismo podía aumentarla (Anderson y col., 2010).

La modulación de la permeabilidad epitelial es un objetivo más que relevante a estudiar para el diseño de nuevos tratamientos preventivos o terapéuticos contra estas enfermedades. Se ha demostrado que la línea celular Caco-2 proveniente de adenocarcinoma de colon humano es un modelo aceptado y ampliamente usado para la evaluación de la integridad y permeabilidad del epitelio intestinal, ya que estas células poseen las características morfológicas y fisiológicas del enterocito maduro y forman uniones estrechas entre células adyacentes (Anderson y col., 2010). Por otro lado, se ha aceptado la aplicación de medidas de la TEER en monocapas de células del epitelio intestinal para evaluar la actividad probiótica (Klingberg y col., 2005).

Aunque un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo* han confirmado que la administración de probióticos puede mejorar la función de la barrera intestinal, pocos estudios se han centrado en la relación entre probióticos y barrera intestinal en casos de hiperbilirrubinemia o tras un daño con TNF- $\alpha$ .



## 2. OBJETIVOS





En base a lo expuesto, se deduce que:

- Algunos microorganismos probióticos han sido exitosamente usados en la prevención y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Entre los mecanismos de acción descritos, destaca la mejora en la función de la barrera intestinal.
- La cepa *L. plantarum* C4 ha sido caracterizada como una interesante candidata a probiótico en sucesivos estudios realizados por el grupo de Inmunología Microbiana de la Universidad de Granada, presentando actividad antimicrobiana e inmunomoduladora.
- La línea celular Caco-2 es un modelo aceptado y ampliamente usado para la evaluación de la integridad y permeabilidad de la barrera intestinal, ya que estas células poseen las características morfológicas y fisiológicas del enterocito maduro y forman uniones estrechas entre células adyacentes.

Por tanto, nos planteamos los siguientes objetivos:

- ✓ Estudiar el daño causado por TNF- $\alpha$  y bilirrubina no conjugada sobre la permeabilidad de la barrera intestinal, utilizando la línea celular Caco-2.
- ✓ Investigar los efectos protector y regenerador que *L. plantarum* C4 podría ejercer sobre la barrera de permeabilidad intestinal frente a dicho daño.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS





### 3.1. Instrumentación

Autoclave Autester Mod. 437-G. JP Selecta (Barcelona, España).

Balanza de precisión, Series 260, Precisa Instruments AG (Dietikon, Suiza).

Baño de agua termostatzado con agitación, Thermolab® GFL 1086 (BurgWedel, Alemania).

Bomba de vacío, KNF LAB Laboport (New Jersey, Estados Unidos).

Campana de flujo laminar, Modelo SBH – 100, Telstar S.A (Barcelona, España).

Centrífuga H-103N Series, Kokusan, Eurocomercial S.A. (Madrid, España).

Cubetas de cuarzo, Hellma (Barcelona, España).

Espectrofotómetro UV/VIS, Lambda 25, Perkin Elmer (Boston, MA, Estados Unidos).

Filtros de esterilización de 0,22  $\mu\text{m}$ , Millex® - GS, Merck Millipore Ltd. (Cork, Irlanda).

Frascos de cultivo tisular de 75  $\text{cm}^2$ , TPP® (Suiza).

Incubador (37°C, atmósfera 95:5 aire/CO<sub>2</sub>, 90% humedad), INCOmed, Memmert (Schwabach, Alemania).

Lector de placas, Thermo Scientific Multiskan EX, Labsystems (Vantaa, Finlandia).

Micropipetas de 0,5-10  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ , Boeco (Alemania).

Micropolímetro Millicell® ERS - 2, Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos).

Microscopio óptico invertido, Casa Álvarez S.A. (Madrid, España).

Osmómetro OSMOMAT 030, Gonotec GmbH (Berlín, Alemania).

Pipeta multicanal 50-300  $\mu\text{L}$ , Finnpipette, Labsystems (Vantaa, Finlandia).

Pipetas estériles de 2 mL, 5 mL y 10 mL.

Pipetas Pasteur de cristal.

Pipeteador electrónico, Easy 60+, Labbox Labware S.L. (Barcelona, España).

Placas bicamerales Transwell®, membrana de policarbonato, tamaño de poro = 3,0  $\mu\text{m}$ , diámetro = 24 mm, n3414, Corning Costar (Cambridge, MA, Estados Unidos).

Placas estériles de 96 pocillos, 3598, Corning Costar (Cambridge, MA, Estados Unidos).

Sonda de pH y temperatura, Crison pH-Meter Basic 20, Crison Instruments, S.A. (Barcelona, España).

Tubos estériles de 10 mL y 50 mL, TPP® (Suiza).

Vortex, Cleaver Scientific Ltd (Rugby, Reino Unido).

### **3.2. Reactivos y disoluciones**

4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), H4034, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Agua bidestilada desionizada, sistema Milli-Q de Millipore, resistividad específica = 18 M $\Omega$ -cm. Modelo R015 (Millipore, Gif Sur Yvette, Francia).

Albúmina de suero bovino (BSA), Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Bilirrubina no conjugada (UCB), B4126, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), M5655, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Colorante azul de metileno, 251170.1609, Panreac Química Sau (Barcelona, España).

Colorante azul tripán, T8154, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Colorante rojo neutro, N4638, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Etanol, Merck (Darmstadt, Alemania).

Factor de necrosis tumoral humano (TNF- $\alpha$ ), H8916, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Hank's balanced salt solution (HBSS), H2387, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Hidróxido sódico, Panreac Química Sau (Barcelona, España).

Lactobacilli Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, USA).

Lactobacilli Man-Rogosa-Sharpe caldo (MRS-broth), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, USA).

L-glutamina, G8540, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), D6546, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Phosphate Buffered Saline (PBS), P4417, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Solución antibiótico-antimicótico, A5955, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Solución de aminoácidos no esenciales, M7145, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Solución tripsina-EDTA 0,25%, T3924, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Suero bovino fetal, F7524, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Estados Unidos).

Tryptic Soy Agar (TSA), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, USA).

#### Disoluciones:

- Solución de TNF- $\alpha$ . Se disolvieron 10  $\mu\text{g}$  de TNF- $\alpha$  en 2 mL de PBS con 0,1% BSA para obtener una solución madre de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ésta se diluyó con medio de cultivo DMEM sin suero y sin antibiótico y suplementado con 0,1% BSA para obtener las concentraciones requeridas para cada ensayo.
- Solución de UCB. Se suspendieron 5,8 mg de UCB en 10 mL de NaOH 0,1 M, obteniendo una solución inicial de concentración 1 mM. Diluyendo 10  $\mu\text{L}$  de ésta en 10 mL de medio de cultivo DMEM sin suero y sin antibiótico, se obtuvo una solución madre 1  $\mu\text{M}$ . Ésta se diluyó con dicho medio de cultivo para obtener la concentración requerida para los ensayos (50 nM).

Las siguientes disoluciones fueron utilizadas durante el mantenimiento del cultivo celular y ensayos de viabilidad y actividad metabólica, se describen en el apartado 3.2. del Capítulo II.

→ Buffer de captación.

→ Isopropanol ácido.

→ Solución acético glacial/etanol.

→ Solución de ajuste.

→ Solución de fijación.

→ Solución de MTT.

→ Solución de rojo neutro.

### **3.3.Preparación de la bacteria**

La cepa *L. plantarum* C4 se almacenó liofilizada a 4°C hasta el momento de los experimentos. Para rehidratarla se disolvió una pequeña cantidad de liofilizado en medio MRS-broth y se incubó a 37°C durante 24 h. Cada 10-15 días, se realizaron pases en tubos con agar MRS y se incubaron bajo las mismas condiciones para mantener las bacterias viables.

El día previo a cada ensayo se realizó una nueva siembra de la cepa en tubos con agar MRS y se llevó a incubación. Para proceder al experimento, siempre en condiciones de esterilidad, se disolvieron en PBS las colonias necesarias para obtener una turbidez correspondiente a una concentración de  $10^8$  ufc/mL. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones a las concentraciones requeridas para cada ensayo.

Con el fin de confirmar dichas concentraciones, se prepararon diluciones seriadas de la suspensión en PBS ( $10^1$ - $10^9$ ), se sembraron en placas de agar MRS y se incubaron a 37°C durante 24-48 h, tras lo cual se procedió al recuento microbiano.

### 3.4. Cultivos celulares

Los ensayos se llevaron a cabo con la línea celular Caco-2. El mantenimiento en cultivo, la siembra, el recuento y la observación de la morfología celular se desarrollaron como se describe en el apartado 3.6. del Capítulo II.

#### • Ensayos de viabilidad celular

El TNF- $\alpha$  y la UCB fueron utilizados como agentes nocivos para el estudio de los efectos protector y regenerador de *L. plantarum* C4 sobre la barrera de permeabilidad intestinal *in vitro* con la línea celular Caco-2.

Previamente a la realización de los ensayos de protección y regeneración de la monocapa celular, se estudió el efecto de todas las soluciones a ensayar (suspensión de *L. plantarum* C4, TNF- $\alpha$  y UCB) sobre la viabilidad del cultivo celular. Para ello, se llevó a cabo el método de tinción con rojo neutro, descrito en el apartado 3.6. del Capítulo II.

En base a los antecedentes bibliográficos y con el fin de diseñar los experimentos de protección y regeneración, se ensayaron distintas concentraciones y distintos tiempos de incubación para cada solución (tabla 31).

El ensayo se realizó para cada sobrenadante en 10 pocillos, obteniendo la media, y en dos días diferentes, para valorar la repetibilidad de la prueba.

#### • Ensayos de actividad metabólica celular

Previamente a la realización de los ensayos de protección y regeneración de la monocapa celular, se estudió el efecto de todas las soluciones a ensayar (suspensión de *L. plantarum* C4, TNF- $\alpha$  y UCB) sobre la actividad metabólica del cultivo celular. Para ello, se llevó a cabo el método del MTT, descrito en el apartado 3.6. del Capítulo II.

De la misma forma que para los ensayos de viabilidad, en base a los antecedentes bibliográficos y con el fin de diseñar los experimentos de protección y regeneración, se ensayaron distintas concentraciones y distintos tiempos de incubación para cada solución (tabla 31).

El ensayo se realizó para cada sobrenadante en 10 pocillos, obteniendo la media, y en dos días diferentes, para valorar la repetibilidad de la prueba.

**Tabla 31.** Concentraciones y tiempos ensayados mediante el método de tinción con rojo neutro y MTT.

	Concentración	Tiempo
<b><i>L. plantarum</i> C4</b>	10 <sup>6</sup> ufc/mL	1 h
	10 <sup>7</sup> ufc/mL	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5 ng/mL	24 h 48 h
	10 ng/mL	
	20 ng/mL	
	40 ng/mL	
<b>UCB</b>	50 nmol/L	6 h

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral-alfa

UCB: bilirrubina no conjugada

• **Siembra de las células Caco-2 en placas bicamerales**

Para los ensayos de protección y regeneración, las células Caco-2 se sembraron en placas bicamerales a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>, como se describe en el apartado 3.6. del Capítulo II. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y los experimentos se realizaron tras 21 días desde la siembra.

Durante todo este período, se comprobó la formación de estrechas uniones celulares durante la diferenciación, y por tanto, la integridad y confluencia de la monocapa. Para ello, se recurrió a la medida de la TEER y al método del transporte del rojo fenol, descritos también en el apartado 3.6. del Capítulo II.

### 3.5. Ensayos de protección y regeneración

Los ensayos de protección y regeneración de la barrera intestinal frente a un agente nocivo se diseñaron en base a los métodos descritos por Zhou y col. (2010) y a los resultados obtenidos en los ensayos previos de viabilidad y actividad metabólica celular.

Para el **ensayo de protección**, las monocapas de células se inocularon apicalmente con una suspensión de  $10^7$  ufc/mL de *L. plantarum* C4 y se incubaron a 37°C durante 1 h, tras lo cual se retiró dicha suspensión y se lavaron las células con buffer de captación.

Seguidamente, se procedió a la adición del agente nocivo; en el caso del TNF- $\alpha$ , éste se adicionó a una concentración de 40 ng/mL durante 24 h en la cámara basolateral para simular las condiciones del organismo humano, ya que dicho factor alcanza los enterocitos desde el medio interno. Sin embargo, la UCB se añadió a concentración de 50 nmol/L durante 6 h sobre la cámara apical, pues la bilirrubina entra en contacto con el enterocito desde el lumen intestinal. Tras dichos períodos de tiempo, se retiraron los agentes nocivos y se lavaron las monocapas celulares, dando por finalizado el ensayo de protección.

Para llevar a cabo el **ensayo de regeneración**, se siguió el mismo método, con la única diferencia de que en primer lugar se aplicó a las células Caco-2 el agente nocivo y, tras el daño, se adicionó el microorganismo probiótico.

Concretamente, los pocillos con células Caco-2 se dividieron en los siguientes grupos, dependiendo del tratamiento adicionado a cada uno:

- **Grupo Control** (n=6). Pocillos con células a las que sólo se les añadió el medio de cultivo que sirvió como vehículo de los tratamientos en los demás grupos de células. En la cámara apical siempre se adicionó DMEM sin suero ni antibiótico (DMEM SA) y en la basolateral DMEM sin suero ni antibiótico, suplementado con 0,1% BSA (DMEM BSA). Este grupo representó el control del experimento, por tanto, en estas placas bicamerales se clonaron las condiciones de vehículo y tiempo empleadas en los otros grupos experimentales.

- **Grupo TNF- $\alpha$**  (n=6). Células tratadas con 2,5 mL de TNF- $\alpha$  a una concentración de 40 ng/mL en DMEM BSA. Éste se añadió en la cámara basolateral y se incubó durante 24 h. En la cámara apical se adicionó DMEM SA. Este grupo sirvió para evaluar el daño causado por TNF- $\alpha$  sobre la permeabilidad de la monocapa celular.
- **Grupo UCB** (n=6). Células tratadas con 1,5 ml de UCB a una concentración de 50 nmol/L en DMEM SA. Ésta se añadió en la cámara apical y se incubó durante 6 h. En la cámara basolateral se adicionó DMEM BSA. Este grupo sirvió para evaluar el daño causado por UCB sobre la permeabilidad de la monocapa celular.
- **Grupo *L. plantarum* C4** (n=6). Células a las que únicamente se les adicionó una suspensión de *L. plantarum* C4 a  $10^7$  ufc/mL en DMEM SA. Ésta se añadió a la cámara apical y se incubó durante 1 h. En la cámara basolateral se adicionó DMEM BSA. Este grupo sirvió para evaluar el efecto del probiótico solo sobre la monocapa celular.
- **Grupo Protección** (n=6). Las células se inocularon apicalmente con una suspensión de  $10^7$  ufc/mL de *L. plantarum* C4 en DMEM SA. Tras 1 h, se aspiró el medio con el microorganismo, se lavaron las monocapas dos veces con buffer de captación y se procedió al tratamiento con TNF- $\alpha$  (40 ng/mL basolateralmente, 24 h) o UCB (50 nmol/L apicalmente, 6 h). Cada agente nocivo se adicionó en 6 pocillos, de manera que hubo dos grupos de protección, que sirvieron para evaluar el efecto protector de *L. plantarum* C4 frente a un daño causado por TNF- $\alpha$  y por UCB.
- **Grupo Regeneración** (n=6). Las células se trataron con TNF- $\alpha$  40 ng/mL en la cámara basolateral durante 24 h o con UCB 50 nmol/L en la cámara apical durante 6 h. Tras dichos períodos, se retiró el agente nocivo, se lavaron las monocapas y se incubaron las células con la suspensión de  $10^7$  ufc/mL de *L. plantarum* C4 en DMEM SA durante 1 h. Cada agente nocivo se adicionó en 6 pocillos, de manera que hubo dos grupos de regeneración, que sirvieron para evaluar el efecto regenerador de *L. plantarum* C4 tras un daño causado por TNF- $\alpha$  y por UCB.

En todos los casos se realizaron medidas de la TEER en las monocapas a lo largo de los experimentos, para el estudio de la permeabilidad de la monocapa celular. Además, para complementar estos resultados, también se evaluó la permeabilidad de las monocapas mediante el método de transporte de rojo fenol.

Ambas medidas se realizaron en todos los grupos antes de comenzar el experimento (tiempo cero), después de cada tratamiento (probiótico, TNF- $\alpha$ , UCB) y al finalizar los ensayos. Los valores se expresaron como aumento o disminución de la TEER y del paso de colorante en relación al tiempo cero.

Las tablas 32 y 33 esquematizan el diseño de los experimentos de protección y regeneración frente a TNF- $\alpha$  y UCB, respectivamente.

**Tabla 32.** Esquema de los ensayos para evaluar los efectos protector y regenerador de *L. plantarum* C4 frente a un daño causado por TNF- $\alpha$ .

Grupo	1 h	24 h	1 h
<b>Control</b>	DMEM	DMEM	DMEM
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	TNF- $\alpha$	-
<b>Protección TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>L. plantarum</i> C4	TNF- $\alpha$	-
<b>Regeneración TNF-<math>\alpha</math></b>	-	TNF- $\alpha$	<i>L. plantarum</i> C4

DMEM: medio de cultivo. TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral-alfa

**Tabla 33.** Esquema de los ensayos para evaluar los efectos protector y regenerador de *L. plantarum* C4 frente a un daño causado por UCB.

Grupo	1 h	6 h	1 h
<b>Control</b>	DMEM	DMEM	DMEM
<b>UCB</b>	-	UCB	-
<b>Protección UCB</b>	<i>L. plantarum</i> C4	UCB	-
<b>Regeneración UCB</b>	-	UCB	<i>L. plantarum</i> C4

DMEM: medio de cultivo. UCB: bilirrubina no conjugada

### **3.6. Estudio estadístico**

Para interpretar los datos obtenidos en los ensayos de protección y regeneración, se usó el programa estadístico *SPSS* 15.0 para Windows.

Se efectuó el análisis estadístico ANOVA con dos colas de distribución, aplicándose el test de la *t de Student* no pareado para comparar diferentes tratamientos en el mismo tiempo. Las diferencias significativas fueron definidas a un valor de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN





#### 4.1. Cultivos celulares

##### • Ensayos de viabilidad y actividad metabólica celular

Tras ensayar la suspensión de *L. plantarum* C4, el TNF- $\alpha$  y la UCB a distintas concentraciones y tiempos, se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla 34. Se observa que *L. plantarum* C4 no afectó a la viabilidad ni actividad metabólica celular. Las células incubadas con TNF- $\alpha$  y UCB no se dañaron en gran medida, pues el valor más bajo de viabilidad fue  $88,64 \pm 12,47\%$ , tras la incubación con TNF- $\alpha$  a 40 ng/mL durante 24 h. En el caso de la UCB, la viabilidad celular fue  $96,17 \pm 15,19\%$ . Los valores de actividad metabólica también fueron altos en la mayoría de los casos.

En base a ello, para los ensayos de protección y regeneración, el TNF- $\alpha$  se adicionó a una concentración de 40 ng/mL y se incubó durante 24 h, la UCB a 50 nmol/L durante 6 h, y la suspensión de *L. plantarum* C4 a  $10^7$  ufc/mL durante 1 h.

Una posible explicación a estas observaciones es que con los métodos de tinción con rojo neutro y MTT se evalúa la apoptosis, y no la permeabilidad celular. Por ello, podríamos concluir que el daño inducido por UCB y TNF- $\alpha$  en la permeabilidad de la barrera intestinal no se produce por muerte celular, sino que podría estar mediado por un debilitamiento de las uniones entre células adyacentes o en cualquier caso, por mecanismos independientes de la apoptosis.

Previamente, Ma y col. (2004b) ya habían observado que TNF- $\alpha$  no induce apoptosis en células Caco-2, sugiriendo que la muerte celular no era el mecanismo envuelto en el aumento de permeabilidad inducido por este factor. Concluyeron que el incremento en la permeabilidad estuvo asociado a una desregulación de la expresión de proteínas y una consiguiente alteración en los sitios de unión. De la misma forma, Bruewer y col. (2003) analizaron la influencia de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$  sobre la estructura y función de la barrera intestinal. Observaron que la permeabilidad se vio aumentada, aún cuando se inhibió la apoptosis inducida por citoquinas. Separaron cualquier efecto proapoptótico de estos factores nocivos de su habilidad de alterar la barrera y concluyeron, por tanto, que las citoquinas proinflamatorias alteran la función de la barrera epitelial por mecanismos independientes de la apoptosis.

**Tabla 34.** Viabilidad y actividad metabólica de las células Caco-2 tras ensayar la suspensión de *L. plantarum* C4, el TNF- $\alpha$  y la UCB.

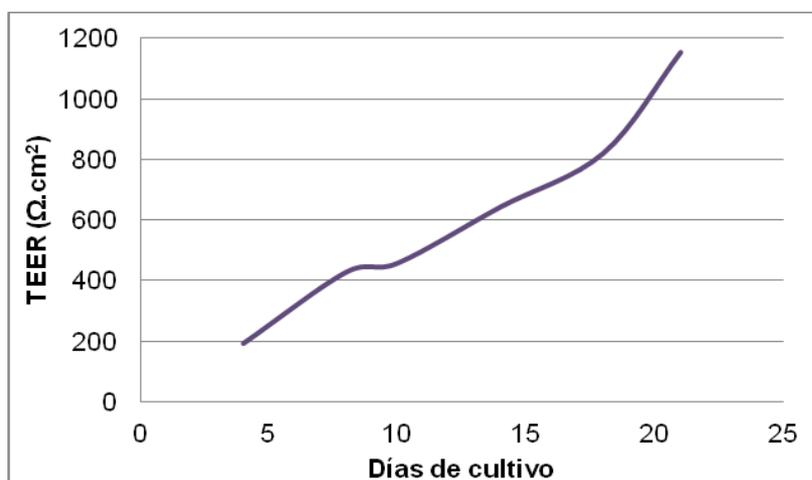
	Concentración	Tiempo	Viabilidad (%)	Actividad metabólica (%)
<b><i>L. plantarum</i> C4</b>	10 <sup>6</sup> ufc/mL	1 h	101,71±7,15	97,51±10,98
	10 <sup>7</sup> ufc/mL		99,46±2,20	94,26±10,02
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5 ng/mL	24 h	120,34±18,77	73,63±11,79
	10 ng/mL		123,63±22,16	76,32±16,19
	20 ng/mL		97,38±10,07	99,21±11,92
	40 ng/mL		88,64±12,47	106,22±11,86
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5 ng/mL	48 h	94,32±4,70	96,51±13,84
	10 ng/mL		96,26±6,44	94,15±14,33
	20 ng/mL		95,65±12,96	91,65±16,67
<b>UCB</b>	50 nmol/L	6 h	96,17±15,19	108,69±2,01

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral-alfa

UCB: bilirrubina no conjugada

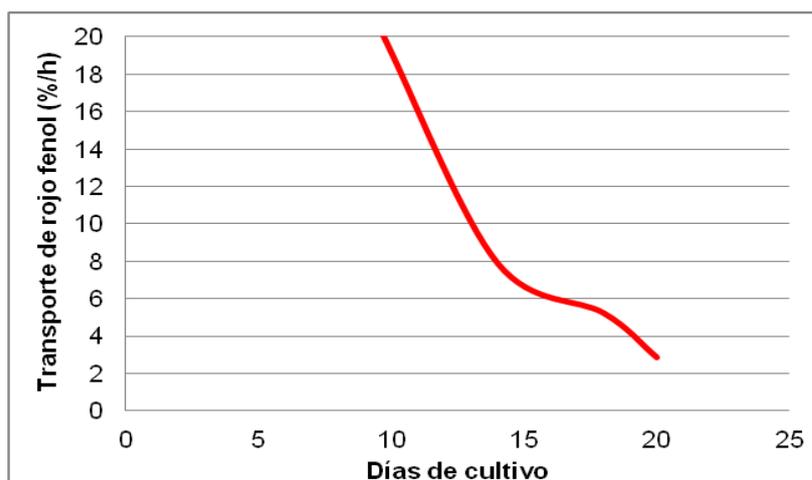
- **Integridad y confluencia de la monocapa**

El aumento de la TEER a lo largo de los 21 días de cultivo tras la siembra de las células se representa en la figura 34. Las células utilizadas en los ensayos siempre alcanzaron valores mayores de  $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .



**Figura 34.** Aumento de la TEER en función del tiempo.

El descenso del transporte de rojo fenol a lo largo de los 21 días de cultivo tras la siembra de las células se representa en la figura 35. Las monocapas con porcentajes de transporte superiores al 5% fueron rechazadas para la realización de los ensayos, los valores medios alcanzados se aproximaron al 3% de transporte.



**Figura 35.** Transporte de rojo fenol en función del tiempo.

## 4.2. Ensayos de protección y regeneración

Como se detalla en la introducción, los efectos inmunomoduladores de los probióticos muestran una promesa para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales y hoy día muchas de las investigaciones con probióticos se centran en sus propiedades antiinflamatorias (Quigley, 2007).

Entre los mecanismos mediante los cuales estos microorganismos beneficiosos protegen de la inflamación intestinal, destaca la mejora en la función de la barrera intestinal (Zakostelska y col., 2011). Diversos autores han demostrado que ciertos probióticos mejoran la permeabilidad intestinal y refuerzan la función de la barrera, apoyando su uso como un potencial tratamiento terapéutico para este tipo de enfermedades (Vanderpool y col., 2008).

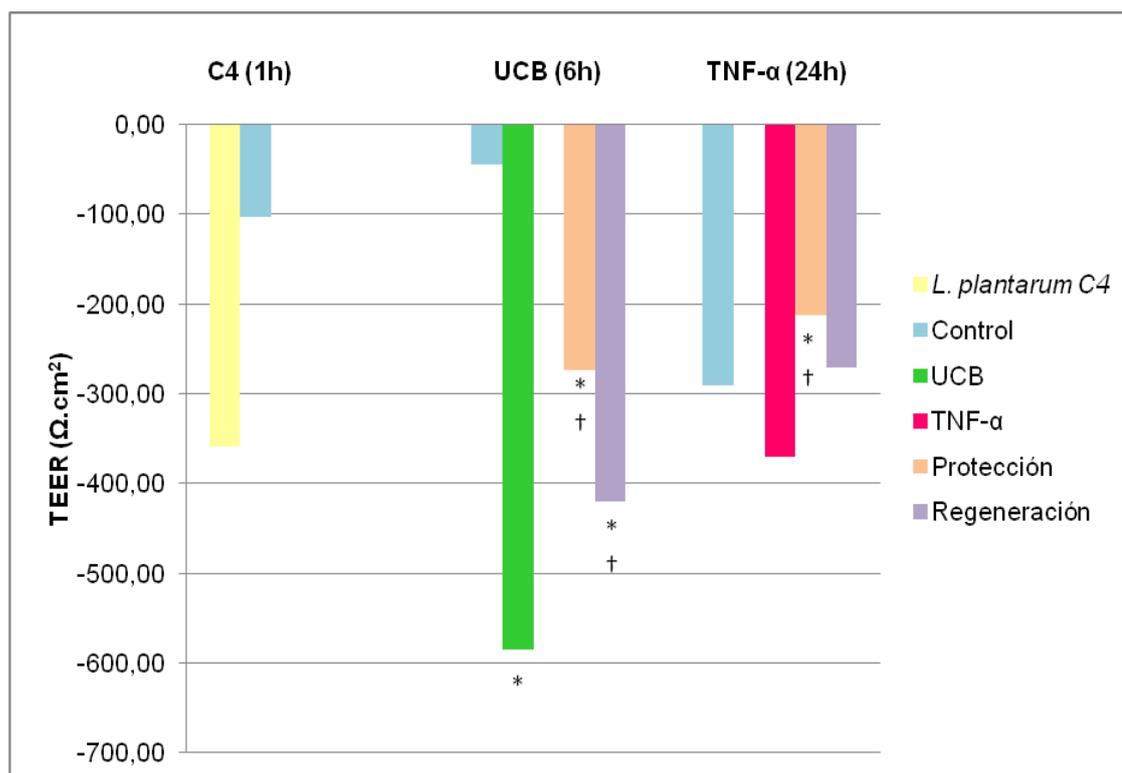
La modulación de la permeabilidad epitelial es, por tanto, un objetivo más que relevante a estudiar para el diseño de nuevos tratamientos preventivos o terapéuticos en este campo.

Se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  y la UCB incrementan la permeabilidad intestinal de forma reversible, y para su estudio se ha propuesto la monitorización de la TEER empleando líneas celulares como la Caco-2 (Ma y col., 2004b; Klingberg y col., 2005; Raimondi y col., 2006; Anderson y col., 2010; Zhou y col., 2010).

Aunque un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo* han confirmado que la administración de probióticos puede ser beneficiosa en términos de mejora de la permeabilidad, pocos estudios se han centrado en la relación entre probióticos y barrera intestinal en casos de hiperbilirrubinemia o tras un daño con TNF- $\alpha$ .

En este contexto, en el presente estudio se llevó a cabo una evaluación de los efectos protector y regenerador de *L. plantarum* C4 sobre la permeabilidad de la barrera intestinal, empleando como modelo *in vitro* la línea celular Caco-2 y como agentes nocivos el TNF- $\alpha$  y la UCB.

El daño producido en la barrera intestinal se expresó como disminución de la **TEER** de la monocapa celular. Los resultados obtenidos tras la incubación con el probiótico, con los agentes nocivos y con las combinaciones de los mismos, para evaluar los efectos de protección y regeneración, se muestran en la figura 36.



**Figura 36.** Pérdida de TEER de la monocapa celular tras los ensayos de protección y regeneración. \*Diferencias estadísticamente significativas frente a grupo control ( $p < 0,05$ ). †Diferencias estadísticamente significativas frente al agente nocivo (UCB o TNF- $\alpha$ ) ( $p < 0,05$ ). TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral-alfa. UCB: bilirrubina no conjugada.

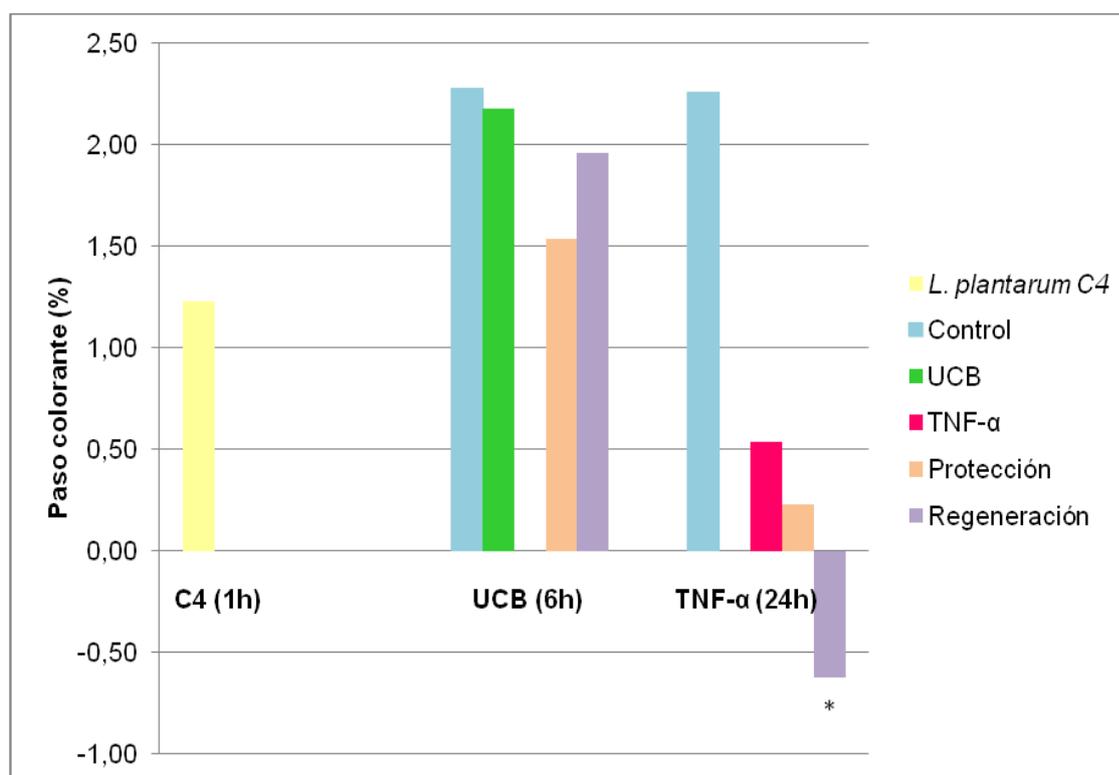
Estos resultados indicaron que altas concentraciones de UCB durante 6 h y TNF- $\alpha$  durante 24 h disminuyeron la TEER de la monocapa celular, siendo esta medida un indicador del daño sobre la permeabilidad de la barrera intestinal. En el caso de la UCB, la TEER fue significativamente menor frente al control, mientras que para TNF- $\alpha$  se observó una tendencia a la significación.

- Tras los ensayos de protección, en los que las células habían sido previamente incubadas con *L. plantarum* C4 durante 1 h, los datos mostraron que el microorganismo fue capaz de mitigar significativamente el daño producido tanto por UCB como por TNF- $\alpha$ , pues se observó que la pérdida de resistencia de la monocapa no fue tan brusca, sino que fue significativamente menor, en comparación con los agentes nocivos solos.

- En el caso de los ensayos de regeneración, en los que las células se incubaron 1 h con *L. plantarum* C4 tras el daño, también se observó una mejora, pues la TEER fue restaurada en comparación con el daño producido por los agentes nocivos solos, existiendo diferencias estadísticamente significativas frente a UCB.

En cualquier caso, como se observa en la figura 36, la mejora en la permeabilidad de la barrera intestinal fue más pronunciada en los casos en que el probiótico se añadió previamente al daño, que en los casos en que la adición se hizo tras el agente nocivo. Podríamos considerar, por tanto, que el efecto protector de *L. plantarum* C4 fue mayor que su efecto regenerador, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos en el caso de la UCB.

Además de la pérdida de resistencia, también se evaluó el aumento de permeabilidad mediante el **paso de colorante rojo fenol**, los resultados se muestran en la figura 37.



**Figura 37.** Aumento/pérdida de paso de colorante de la monocapa celular tras los ensayos de protección y regeneración. \*Diferencias estadísticamente significativas frente a Grupo Control ( $p < 0,05$ ). TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral-alfa. UCB: bilirrubina no conjugada.

Cuando la permeabilidad fue evaluada con este método, tanto el TNF- $\alpha$  como la UCB también mostraron un daño sobre la monocapa celular, pues se observó una permeabilidad aumentada, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

- Tras los experimentos de protección y regeneración, el probiótico mostró una mejora de la permeabilidad frente al daño en el caso de UCB, siendo el efecto protector más pronunciado que el regenerador, de la misma forma que se observó con el método de la TEER.

Con respecto al TNF- $\alpha$ , se encontró una mejora significativa de la permeabilidad cuando el probiótico se añadió tras el daño, observando en este caso un efecto regenerador más pronunciado, frente al efecto protector. Aún así, con el método del transporte de rojo fenol no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, debido probablemente a que se encontraron importantes variaciones entre los pocillos con respecto a los valores de paso de colorante.

Consideramos, por tanto, que este método no proporciona medidas reproducibles y no se debería emplear como indicador de la mejora o empeoramiento de la función de la barrera intestinal, aunque sí sea adecuado para evaluar la formación de una monocapa íntegra y confluyente en el período de crecimiento post-siembra.

Es importante destacar que los lactobacilos modulan la liberación de citoquinas proinflamatorias de células epiteliales de una forma dependiente de la cepa y de la dosis. Zhang y col. (2005) investigaron la habilidad de la cepa *L. rhamnosus* GG viva y muerta para atenuar la secreción de IL-8 inducida por TNF- $\alpha$  en células Caco-2. Encontraron que con dosis de  $10^6$ - $10^8$  ufc/mL, la secreción era reducida. Sin embargo, a concentraciones más altas, el probiótico incluso incrementó dicha secreción por encima de lo observado con TNF- $\alpha$  solo, dando más apoyo a la idea de que la determinación de la dosis correcta es crítica para un uso terapéutico exitoso. De hecho, nuestros resultados mostraron que *L. plantarum* C4 a concentración de  $10^7$  ufc/mL tendió también a aumentar la permeabilidad de la monocapa celular, aunque también presentó efectos protector y regenerador frente al daño.

Otros investigadores han mostrado que *Lactobacillus reuteri* reduce la secreción de IL-8 inducida por TNF- $\alpha$  (Ma y col., 2004a). Además, la secreción de IL-8 también fue disminuida con VSL#3, una combinación de cuatro cepas de *Lactobacillus*, tres de

*Bifidobacterium* y una de *Streptococcus* (Jijon y col., 2004), y por diferentes cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* y *L. plantarum* (Nemeth y col., 2006).

Por otro lado, Watson y col. (2012) observaron que, tras la administración de TNF- $\alpha$  en ratones, la función de la barrera intestinal es alterada por un aumento en el desprendimiento de células y por el simultáneo desprendimiento de dos o más células en ciertas zonas, produciendo microerosiones que no pueden ser selladas por una redistribución de proteínas de las uniones estrechas. Explicaron que, aunque bajas dosis de TNF- $\alpha$  pueden inducir cambios estructurales y funcionales en las uniones estrechas, se requieren dosis altas para inducir desprendimiento de células.

Son muchas las investigaciones que relacionan el género *Lactobacillus* con las enfermedades inflamatorias intestinales. Por ejemplo, *L. rhamnosus* GG mejoró la función de la barrera intestinal en niños con enfermedad de Crohn, y su asociación con el fármaco antiinflamatorio mesalazina fue capaz de prolongar el tiempo libre de recaídas en colitis ulcerosa (Gupta y col., 2000; Zocco y col., 2006). Matsumoto y col. (2005) observaron que *L. casei* Shirota fue capaz de desregular citoquinas proinflamatorias como IL-6 en modelos murinos con enfermedad inflamatoria intestinal crónica. De la misma forma, una combinación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* mostraron una represión en la transcripción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) en ratones con colitis experimental (Lee y col., 2008).

Fang y col. (2010) investigaron los efectos antiinflamatorio y de refuerzo de la barrera intestinal por la cepa *L. casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35 en células epiteliales intestinales expuestas a LPS de *Salmonella*. La inoculación apical de la cepa Lcr35 inhibió la secreción de IL-8. Además, cuando se incubaron simultáneamente ambos microorganismos, la resistencia de la monocapa se vio aumentada frente a la monocapa incubada solo con LPS. Concluyeron, por tanto, que la cepa Lcr35 puede ejercer efecto antiinflamatorio y mejorar la disfunción de la barrera en un epitelio inflamado pre-tratado con LPS de *Salmonella in vitro*.

Centrándonos en la evaluación de la permeabilidad de la barrera intestinal y en los estudios realizados recientemente, vemos que algunos probióticos han demostrado mejorar la permeabilidad intestinal inducida por patógenos *in vitro* (Klingberg y col., 2005; Sherman y col., 2005), mientras que otros mejoran la integridad de las uniones estrechas entre células epiteliales intestinales sin debilitar (Klingberg y col., 2005; Ewaschuk y col., 2008; Putaala y col., 2008).

La mezcla de probióticos VSL#3, que contiene la cepa *L. plantarum* MB452 entre otras, es conocida por incrementar la integridad *in vitro* en la línea celular T84 (Otte y col., 2004), reducir la colitis en ratones (Shibolet y col., 2002; Di Giacinto y col., 2005) y mejorar la salud intestinal en humanos (Gionchetti y col., 2000; Kim y col., 2003; Bibiloni y col., 2005).

Anderson y col. (2010) determinaron el efecto de *L. plantarum* MB452 sobre la integridad de las uniones estrechas, midiendo la TEER a lo largo de monocapas de células Caco-2. Dicha cepa causó un incremento dosis-dependiente de la resistencia, en comparación con un medio control. Estos autores concluyeron que el incremento en la expresión de genes envueltos en la formación de uniones estrechas es un posible mecanismo por el que *L. plantarum* MB452 mejora la función de la barrera intestinal.

Donato y col. (2010) observaron que la incubación de la línea celular Caco-2 con IFN- $\gamma$  y seguidamente con TNF- $\alpha$  durante 24 h disminuyó la TEER y el efecto se prolongó hasta 32 h después de la estimulación. Sin embargo, esto se evitó cuando las monocapas celulares habían sido previamente tratadas con *L. rhamnosus* GG. Explicaron también que el efecto protector de esta cepa requiere que las bacterias estén vivas y metabólicamente activas, pues la muerte por calor abolió sus beneficios, y que el efecto probiótico es cepa-dependiente. Eun y col. (2011) también observaron una TEER disminuida tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Por el contrario, un tratamiento previo con *L. casei* revirtió la disminución de la TEER, concluyendo que esta cepa previene las disfunciones de la barrera intestinal inducidas por citoquinas en células epiteliales intestinales.

En un estudio sobre la aplicación de la medida de la TEER en monocapas de células Caco-2 para evaluar la actividad probiótica, se investigaron cinco lactobacilos. De entre ellos, las cepas *L. plantarum* MF1298 y *Lactobacillus salivarius* DC5 mostraron el mayor incremento en la TEER de las monocapas celulares, y este aumento resultó ser, una vez más, dosis-dependiente. Además, la preincubación con la cepa MF1298 atenuó el descenso de la TEER inducido por *Lysteria monocytogenes* (Klingberg y col., 2005).

Sabiendo que la UCB incrementa la permeabilidad del epitelio intestinal en un modelo *in vitro* (Raimondi y col., 2006), Zhou y col. (2010) investigaron los efectos y mecanismos asociados entre una cepa de *L. plantarum* y la UCB en la barrera intestinal, midiendo viabilidad, proporción de apoptosis y actividad proteína kinasa C de las células Caco-2, además de monitorizar la TEER. Su estudio demostró que

efectivamente la UCB produjo citotoxicidad y disminuyó la TEER de la monocapa celular. Tras un tratamiento con *L. plantarum* a  $10^8$  ufc/mL durante 1 h, dichos efectos fueron mitigados. De manera que concluyeron que este microorganismo ejerció un efecto protector frente al daño producido por UCB en la monocapa de células Caco-2. Además, restauró la estructura y distribución de las proteínas de las uniones estrechas.

Chen y col. (2012) estudiaron si *L. kefirifaciens* M1, aislado de granos de kéfir, era capaz de mejorar la colitis experimental *in vivo* e *in vitro*. Observaron que dicha cepa podía reforzar la función de la barrera intestinal *in vitro* incrementando la TEER de las células. Basándose en estos resultados, concluyeron que este probiótico tiene el potencial para ser aplicado en productos lácteos fermentados como una terapia alternativa para desórdenes intestinales.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los publicados en investigaciones previas y apoyan el potencial efecto probiótico de la cepa *L. plantarum* C4.

Por último, teniendo en cuenta que el objetivo principal del presente trabajo fue el desarrollo de una leche de cabra fermentada con efecto probiótico y el estudio de sus beneficios para la salud, es interesante mencionar algunos estudios que relacionan ciertos componentes de la dieta con la integridad intestinal, pues se ha observado que éstos también son capaces de regular las uniones estrechas (Ulluwishewa y col., 2011).

Por ejemplo, la leche de soja fermentada con *L. plantarum*, *Lactobacillus fermentum* y *L. rhamnosus* mitigó la disminución de la TEER inducida por IFN- $\gamma$  en la línea celular Caco-2/TC7. Dicho efecto no se encontró con la leche de soja sin fermentar. Estos autores atribuyeron el efecto protector a las agliconas de isoflavona sintetizadas durante la fermentación, demostrando la importancia de las interacciones entre la bacteria y el alimento en la regulación de la función de la barrera intestinal (Di Cagno y col., 2010).

Staples y col. (2005) investigaron la influencia de la lactosa, calcio y magnesio de productos lácteos sobre la función de la barrera intestinal y el transporte de nutrientes, empleando dos modelos *in vitro* que incorporaban la línea celular Caco-2. Según los datos obtenidos, el magnesio y el calcio aumentaron la resistencia de la monocapa, frente a un control con glucosa. Concluyeron que estos resultados ayudan a dilucidar la acción de los componentes lácteos sobre la función de las

células intestinales. Además, destacaron que la hidrólisis limitada de la lactosa resulta en una liberación gradual de sacáridos al intestino, causando un impacto mínimo en la permeabilidad, en comparación con el control de glucosa. Este trabajo demostró una vez más que la línea celular Caco-2 es una herramienta de gran ayuda en la formulación de nuevos alimentos funcionales.

De la misma forma, Carvalho y col. (2012) publicaron que la leche de cabra es capaz de reparar la función de la barrera intestinal dañada por *Escherichia coli* enteroagregativa, y que esta leche con una concentración aumentada de lisozima ofrece una protección adicional.

Es importante considerar las interacciones entre los diferentes componentes de la barrera intestinal cuando se desarrollan estrategias para aumentar su integridad usando alimentos y/o bacterias. Actualmente, existe un aumentado interés en el estudio de los efectos beneficiosos de los probióticos debido a sus aplicaciones comerciales.

El presente estudio proporciona una mayor justificación para el potencial uso terapéutico de los probióticos en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo, los mecanismos por los que estos microorganismos mejoran la función de la barrera intestinal siguen sin estar del todo claros. Además, dicha barrera alberga un ambiente complejo y la regulación de su función no puede ser entendida sólo con modelos *in vitro*, por lo que es esencial recurrir a futuras investigaciones *in vivo*.



## 5. CONCLUSIONES





1. El daño causado en la barrera de permeabilidad constituida por células de mucosa intestinal fue parcialmente restaurado por la cepa *Lactobacillus plantarum* C4. Por tanto, dicha cepa ejerció efectos de protección y regeneración de la barrera de permeabilidad.
2. Nuestros resultados sugieren que la cepa *Lactobacillus plantarum* C4, añadida a productos lácteos fermentados, tendría potencial para prevenir o atenuar disfunciones en la barrera intestinal.
3. En nuestro modelo experimental, las medidas de resistencia eléctrica transepitelial proporcionan resultados más homogéneos y precisos que el método del paso de colorante rojo fenol.

### **Conclusions**

1. The damage caused in the permeability barrier formed by intestinal mucosa cells was partially restored by the strain *Lactobacillus plantarum* C4. Therefore, this strain exerted protective and regenerative effects of the permeability barrier.
2. Our results suggest that the strain *Lactobacillus plantarum* C4, added to fermented milk products, would have the potential to prevent or attenuate intestinal barrier dysfunction.
3. In our experimental model, the transepithelial electrical resistance measurements provide more homogeneous and accurate results, compared to the phenol red transport method.



## 6. BIBLIOGRAFÍA





**A**

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochem Pharmacol* 2006, 72:1605-21.

Alberda C, Gramlich L, Meddings J, Field C, Mccargar L, Kusogiannis D, Fedorak R, Madsen K. Effects of probiotic therapy in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2007, 85:816-23.

Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* 2010, 10:316.

**B**

Backed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:15718-23.

Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005, 307:1915-20.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* 2001, 357:539-45.

Baró L, López-Huertas E, Boza JJ. *Leche y derivados lácteos*. En: Gil A (Ed.) *Tratado de Nutrición*. Tomo II: *Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2010.

Bergillos-Meca T, Navarro-Alarcón M, Cabrera-Vique C, Artacho R, Olalla M, Giménez R, Moreno-Montoro M, Ruiz-Bravo A, Lasserrot A, Ruiz-López MD. The probiotic bacterial strain *Lactobacillus fermentum* D3 increases *in vitro* the bioavailability of Ca, P, and Zn in fermented goat milk. *Biol Trace Elem Res* 2013, 151(2):307-14.

Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 Probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005, 100(7):1539-46.

Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins, Nusrat. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003, 171:6164-72.

Bujalance C, Moreno E, Jiménez-Valera M, Ruiz-Bravo A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int J Food Microbiol* 2007, 113:28-34.

## C

Cabré E, Gassull MA. *Nutrición en la enfermedad inflamatoria intestinal*. En: Gil A (Ed.) *Tratado de Nutrición*. Tomo IV: *Nutrición Clínica*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2010.

Campbell BJ, Yu LG, Rhodes JM. Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: a possible role in cancer development. *Glycoconj J* 2001, 18:851-8.

Carvalho EB, Maga EA, Quetz JS, Lima IF, Magalhães HY, Rodrigues FA, Silva AV, Prata MM, Cavalcante PA, Havt A, Bertolini M, Bertolini LR, Lima AA. Goat milk with and without increased concentrations of lysozyme improves repair of intestinal cell damage induced by enteroaggregative *Escherichia coli*. *BMC Gastroenterol* 2012, 12:106.

Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe* 2012, 18(4):405-13.

Chen YP, Hsiao PJ, Hong WS, Dai TY, Chen MJ. *Lactobacillus kefirifaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis *in vitro* and *in vivo*. *J Dairy Sci* 2012, 95:63-74.

Chian SS, Pan TM. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, 93(3):903-16.

Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996, 12:274-7.

Coussens, LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002, 420:860-7.

Cremonini F, Talley NJ. Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterol Clin North Am* 2005, 34:189-204.

## D

Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997, 84:920-35.

Di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello CG, Vincentini O, Silano M, Giuliani G, De Angelis M, Gobbetti M. Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2010, 58:10338-46.

Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005, 174(6):3237-46.

Donato KA, Gareau MG, Wang YJJ, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signaling. *Microbiology* 2010, 156:3288-97.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995, 102:448-55.

## **E**

Elson CO. Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000, 119:254-7.

Eun CS, Kim YS, Han DS, Choi JH, Lee R, Park YK. *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *APMIS* 2011, 119(1):49-56.

Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, Looijer-van Langen M, Madsen KL. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008, 295(5):G1025-34.

## **F**

Fang HW, Fang SB, Chiau JSC, Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Cheng ML, Lee HC. Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* on *Salmonella* lipopolysaccharide induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells. *J Med Microbiol* 2010, 59:573-9.

FAO/WHO. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>

Farnsworth JP, Li J, Hendricks GM, Guo MR. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Res* 2006, 65:113-21.

Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL, Huebner C, Petermann I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res* 2007, 622:70-83.

Fiocchi C. More answers and more questions in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2003, 19:325-6.

Frontela C. *Efecto de la adición de fitasa sobre la biodisponibilidad mineral in vitro en papillas infantiles*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2007.

Frontela C, Canali R, Virgili F. Empleo de compuestos fenólicos en la dieta para modular la respuesta inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 2010, 33(4):307-12.

Frontela-Saseta C, López-Nicolás R, González-Bermúdez CA, Martínez-Graciá C, Ros-Berruezo G. Anti-inflammatory properties of fruit juices enriched with pine bark extract in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium: the effect of gastrointestinal digestion. *Food Chem Toxicol* 2013, 53:94-9.

## G

Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo controlled trial. *Gastroenterology* 2000, 119(2):305-9.

Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000, 31(4):453-7.

## H

Halpern GM, Prindiville T, Blankenburg M, Hsia T, Gershwin ME. Treatment of irritable bowel syndrome with Lateol Fort: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Am J Gastroenterol* 1996, 91:1579-85.

Hanauer SB. Update on medical management of inflammatory bowel disease: ulcerative colitis. *Rev Gastroenterol Disord* 2001, 1(4):169-76.

## I

Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004, 18:299-313.

## K

Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer RJM, Wells JM. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vitro* and protective effects on the epithelial barrier. *Am Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 298:G851-9.

Kassen R, Rainey PB. The ecology and genetics of microbial diversity. *Ann Rev Microbiol* 2004, 58:207-31.

Kehagias C, Csapo J, Konteles S, Kolokitha E, Koulouris S, Csapo-Kiss ZS. Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cow's, ewe's, goat's milk and modified whey powder products. *Int Dairy J* 2008, 18:396-402.

Keohane J, Ryan K, Shanahan F. *Lactobacillus* in the gastrointestinal tract. En: Ljungh A, Wadström T (Eds.) *Lactobacillus molecular biology: from genomics to probiotics*. Caister Academic Press. Norfolk, 2009.

Kim HJ, Camilleri M, McKinzie S, Lempke MB, Burton DD, Thomforde GM, Zinsmeister AR. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2003, 17(7):895-904.

Klingberg TD, Pedersen MH, Cencic A, Budde BB. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71(11):7528-30.

Kongo JM, Gomes AM, Malcata FX. Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* in a controlled bioreactor. *Lett Appl Microbiol* 2006, 42:595-9.

## **L**

Laitinen L. *Caco-2 cell cultures in the assessment of intestinal absorption: effects of some co-administered drugs and natural compounds in biological matrices*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Helsinki, 2006.

Lee HS, Han SY, Bae EA, Huh CS, Ahn YT, Lee JH, Kim DH. Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int Immunopharmacol* 2008, 8(4):574-80.

Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, Del Vecchio Blanco C. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol* 2005, 39:540-3.

## **M**

Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumour necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004a, 72:5308-14.

Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF- $\alpha$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- $\kappa$ B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004b, 286:G367-76.

Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 2003, 52:827-33.

Madsen K, Cornish A, Soper P, Mckaingney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001, 121:580-91.

Martín-Diana AB, Janer C, Peláez C, Requena T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria A.B. *Int Dairy J* 2003, 13:827-33.

Masco L, Huys G, De Brandt E, Temmerman R, Swings J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 2005, 102:221-30.

Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, Suzuki A, Sata M. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2005, 140(3):417-26.

Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T. Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. *J Nutr* 2007, 137:798S-802S.

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005, 122:107-18.

Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, Monteleone I, Fina D, Caruso R, Gioia V, Ballerini S, Federici G, Bernardini S, Pallone F, MacDonald TT. Post-transcriptional regulation of Smad7 in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005, 129(5):1420-9.

## **N**

Nemeth E, Fajdiga S, Malago J, Koninkx J, Tooten P, Van Dijk J. Inhibition of *Salmonella*-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli. *Int J Food Microbiol* 2006, 112:266-74.

Niedzielin K, Kordecji H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001, 13:1143-7.

Nissle, A. Weiteres über die grundlagen und praxis der mutafloerbehandlung. *Dtsch Med Wochenschr* 1925, 44:1809-13.

Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahrné S, Jeppsson B. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000, 95:1231-8.

## **O**

O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, Fitzgibbon J, Lee G, O'Sullivan G, Shanahan F, Collins, JK. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2001, 15:1219-25.

O'Sullivan MA, O'Morain CA. Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomized double-blind placebo-controlled crossover study. *Dig Liver Dis* 2000, 32:294-301.

Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 286(4):G613-26.

## **P**

Putala H, Salusjarvi T, Nordstrom M, Saarinen M, Ouwehand AC, Bech- Hansen E, Rautonen N. Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. *Res Microbiol* 2008, 195(9-10):692-8.

## **Q**

Quigley EM. Probiotics in the management of colonic disorders. *Curr Gastroenterol Rep* 2007, 9(5):434-40.

## **R**

Raimondi F, Crivaro V, Capasso L, Maiuri L, Santoro P, Tucci M, Barone MV, Pappacoda S, Paludetto R. Unconjugated bilirubin modulates the intestinal barrier function in a human-derived *in vitro* model. *Pediatr Res* 2006, 60:30-3.

Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006, 130:731-46.

Rettger LF, Levy MN, Weinstein L, Weiss JE. *Lactobacillus acidophilus* and its therapeutic application. *Ann Intern Med* 1936, 10(2):274-5.

Riedel CU, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns BJ, Blum S. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World J Gastroenterol* 2006, 12:3729-35.

Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev* 2009, 67:363-78.

Romier-Crouzet B, Van De Walle J, During A, Joly A, Rousseau C. Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 2009, 47:1221-30.

## **S**

Sen S, Mullan MM, Parker TJ, Woolner JT, Tarry SA, Hunter JO. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002, 47:2615-20.

Sergent T, Piront N, Meurice J, Toussaint O, Schneider Y. Antiinflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. *Chem Biol Interact* 2010, 188:659-67.

Shanahan F. Immunology. Therapeutic manipulation of gut flora. *Science* 2000, 289:1311-2.

Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PS, Goulet J, Tompkins TA. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun* 2005, 73(8):5183-8.

Shibolet O, Karmeli F, Eliakim R, Swennen E, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M, Morgenstern S, Rachmilewitz D. Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2002, 8(6):399-406.

Staples KA, Durham RJ, Jones MR. Evidence for the role of dairy minerals and lactose in enhancing intestinal health. *Aust J Dairy Technol* 2005, 60(2):127-31.

## **T**

Tratnik L, Bozanic R, Herceg Z, Drgalic I. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *Int Journal Dairy Technol* 2006, 59:40-6.

## **U**

Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr* 2011, 141:769-76.

## **V**

Vagefi PA, Longo WE. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Colorectal Cancer* 2005, 4:313-9.

Vanderpool C, Yan F, Polk DB. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2008, 14(11):1585-96.

Vanhoutte T, De PV, De BE, Verbeke K, Swings J, Huys G. Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:5990-7.

Vaughan EE, Mollet B. Probiotics in the new millennium. *Nahrung* 1999, 43(3):S148-53.

Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary

data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999, 13:1103-8.

## W

Waldner M, Neurath M. Novel cytokine-targeted therapies and intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2009, 9:702-7.

Walter J. *The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract*. En: Tannock GW (Ed.) *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. Caister Academic Press. Norfolk, 2005.

Watson AJM, Hughes KR. TNF- $\alpha$ -induced intestinal epithelial cell shedding: implications for intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2012, 1258:1-8.

## X

Xu J, Gordon JI. Inaugural Article: honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:10452-9.

## Y

Yan F, Cao H, Cover T, Whitehead R, Washington M, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007, 132:562-75.

Yapali S, Hamzaoglu HO. Anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2007, 20(1):48-53.

## Z

Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, Hornova M, Srutkova D, Hudcovic T, Ridl J, Tlaskalova-Hogenova H. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One* 2011, 6(11):e27961.

Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 2005, 135:1752-6.

Zhou Y, Qin H, Zhang M, Shen T, Chen H, Ma Y, Chu Z, Zhang P, Liu Z. *Lactobacillus plantarum* inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction induced by unconjugated bilirubin. *Br J Nutr* 2010, 104:390-401.

Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006, 23:1567-74.



# CHAPTER IV

***In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential probiotic activity of C4 *Lactobacillus plantarum* in batch culture systems**





# INDEX

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	269
1.1. Human microbiota .....	271
1.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> C4 .....	271
1.3. Short chain fatty acids .....	272
1.4. Methods to evaluate the gut microflora .....	272
<b>2. AIMS</b> .....	275
<b>3. MATERIAL AND METHODS</b> .....	279
3.1. Materials .....	281
3.2. Chemicals .....	281
3.3. Bacterial strains and culture conditions .....	283
3.4. Bacterial growth curve determination .....	283
3.5. Tissue culture assays .....	284
• Caco-2 cell culture .....	284
• Probiotic adhesion to Caco-2 cells .....	284
3.6. Physicochemical assays: bacterial adhesion to hydrophobic solvent .....	285
3.7. Batch cultures .....	286
• Probiotics culture preparation .....	286
• Faecal sample preparation .....	286
• <i>In vitro</i> batch cultures studies .....	286
• Enumeration of bacterial populations by FISH analysis .....	289
• SCFA analysis .....	290
3.8. Statistical analysis .....	291
<b>4. RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	293
4.1. Bacterial growth curve determination .....	295
4.2. Probiotic adhesion to Caco-2 cells .....	296
4.3. Bacterial adhesion to hydrophobic solvent .....	297
4.4. Batch cultures .....	299
• Modulation of bacterial populations by FISH analysis .....	299
• SCFA production in batch cultures .....	305
<b>5. CONCLUSIONS</b> .....	309
<b>6. REFERENCES</b> .....	313



# 1. INTRODUCTION





### 1.1. Human microbiota

The human colonic microbiota is a complex ecosystem harbouring a vast range of bacteria and dominated by obligate anaerobes that can reach levels of over  $10^{11}$  cells per gram of contents (Bäckhed et al., 2005). The nutritionally and physiologically diverse range of bacteria, promotes normal intestinal function, and offers the host protection against infections.

A disturbance in the composition of the complex population of microorganisms constituting the gut microbiota, due to pathogens, dietary antigens or other harmful substances, can however predispose towards several gastrointestinal disorders and lead to intestinal dysfunction (Fooks et al., 2003; Manichanh et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006; Tilg, 2010; Frank et al., 2011). Disturbance of the microbiota is seen in some elderly subjects, and also sometimes induced by antibiotic treatment and by extended periods in hospital; this can result in increased gut infections (Gerding et al., 1995; Bignardi, 1998; McFarland et al., 1999; Mueller et al., 2006; McFarland, 2008).

Restoration of the altered microbiota or preservation of a healthy microbial balance with probiotics could protect against pathogen invasion and/or colonisation, as well as help improve gut health and well-being (Hickson, 2011). Currently, there is considerable interest in the relative efficacy of using single strains of probiotics and mixtures of different genera and species (Chapman et al., 2012). Probiotic bacteria often belong to the genera *Lactobacillus*, based on attributed health-promoting benefits, furthermore *Lactobacillus* have a long and safe history in the manufacture of dairy products (Vaughan et al., 1999; Masco et al., 2005). Probiotics have been observed to act by preventing adherence, establishment, replication, and/or virulence of specific enteropathogens (Saavedra et al., 1995). A number of mechanisms have been proposed; decreasing the luminal pH via the production of organic and short chain fatty acids (SCFA), rendering specific nutrients unavailable to pathogens, and/or producing specific inhibitory compounds such as bacteriocins (Sanders et al., 1993). In the normal intestinal flora these mechanisms are essential to the component bacterial populations, as a means of gaining advantage over competing bacteria.

### 1.2. *Lactobacillus plantarum* C4

In this context, the putative probiotic strain *L. plantarum* C4 is being tested as a possible probiotic to be added in a functional fermented goat's skimmed milk. This microorganism, isolated from a commercial kefir, fulfils the *in vitro* criteria for the selection of potentially effective probiotic bacteria, as it resists acid pH and bile and

has antimicrobial and immune-modulating properties. The premise is to include this bacterium in a fermented goat's skimmed milk, skimmed milk has previously been found to have a good buffer capacity and to be an appropriate vehicle for the intragastric administration of lactobacilli to mice (Bujalance et al., 2007).

### **1.3. Short chain fatty acids**

Dietary compounds not digested by the host are the main carbon source from which gut microorganisms obtain energy. These substrates, which mainly include plant oligo and polysaccharides, can be subjected to gut bacterial metabolic transformations and hence they can have a major influence on human nutrition and health (Flint et al., 2008). SCFA and lactate are the main products arising from the microbial fermentation of carbohydrates. SCFA can provide energy to the colonic epithelium, modulate cholesterol and lipid metabolism, suppress pathogenic intestinal bacteria and modulate the immune system (Cummings et al., 1997; Topping et al., 2001; Salazar et al., 2009).

Chemical composition and availability of fermentable carbohydrates in the colon have a strong influence on the gut microbiota composition. Specific carbohydrates are now being tested for prebiotic potential to assess abilities to stimulate selected beneficial bacteria in the colon (Gibson et al., 1995). The most studied prebiotics are inulin and fructooligosaccharides (FOS) (Roberfroid, 2007), and they have a recognised bifidogenic effect (Gibson et al., 1995; Kruse et al., 1999; Bouhnik et al., 2004; Rossi et al., 2005).

### **1.4. Methods to evaluate the gut microflora**

Observations on the normal gut microflora have been largely derived from quantitative plate culture and phenotypic characterisation, which have limitations in terms of recovery efficiency and operator subjectivity (Harmsen et al., 1999). Moreover, as the proximal colon is physically inaccessible for routine purposes, the majority of microbial studies on fermentation have been carried out with faecal bacteria in either batch culture or single stage chemostats (Macfarlane et al., 1994; Brück et al., 2002).

In this context, pH-controlled faecal batch cultures allow determination of the fermentability of various substrates in the intestinal lumen. Compared to previous non pH-controlled experiments (Salazar et al., 2008), this design is a more realistic simulation of the conditions in the human distal colon with regard to local pH,

substrate availability and transit time, as the semisolid luminal contents of the distal colon are almost static therein.

However, marked differences can exist due to probiotics adherence to the epithelial cells and the intestinal barrier, as the ability of probiotic lactic acid bacteria (LAB) to adhere to intestinal mucosa has been suggested to influence their interaction with the host and the microorganisms present therein (Alander et al., 1999; Ouwehand et al., 1999; Deepika et al., 2009). This process cannot currently be simulated in a vessel system. In contrast, *in vitro* assays with the Caco-2 cell line have been used to study the adherence of the bacterial cells to the intestinal monolayer (Deepika et al., 2009; Deepika et al., 2011; Ren et al., 2012).

Furthermore, it has been postulated that several physicochemical properties of probiotic cells, such as hydrophobicity, could be a good indicator to preselect strains with a positive adhesive character. Therefore, these models could give us a more realistic idea of the complex conditions of the colon, while addressing not only for intestinal lumen but also for epithelial barrier.

In order to gain further insight into the changes that *L. plantarum* C4 may mediate in the intestinal microbiota, pH-controlled faecal batch cultures were carried out, reflecting the distal colon to investigate the influence of this strain on the human colonic microbiota, in comparison with *Lactobacillus rhamnosus* GG, a species widely used as adjunct culture in functional dairy products. We quantified modifications in the levels of selected microbial groups by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH), assessed the effect of the probiotic treatments on SCFA production and established possible relationships between metabolic changes and variations in microbial populations. Concomitantly, hydrophobic character and ability of both bacterial cells to adhere *in vitro* to Caco-2 cells were investigated.

Both strains were considered in order to ascertain if *L. plantarum* C4 and its products could influence the microbiota dynamics to give similar or higher benefits to those observed by *L. rhamnosus* GG. The use of our strain adjunct in fermented goat's milk may have the advantage over other known dairy products, of providing a potential probiotic and a highly nutritional functional food, in a single step.



## 2. AIMS





In this context, it can be deduced:

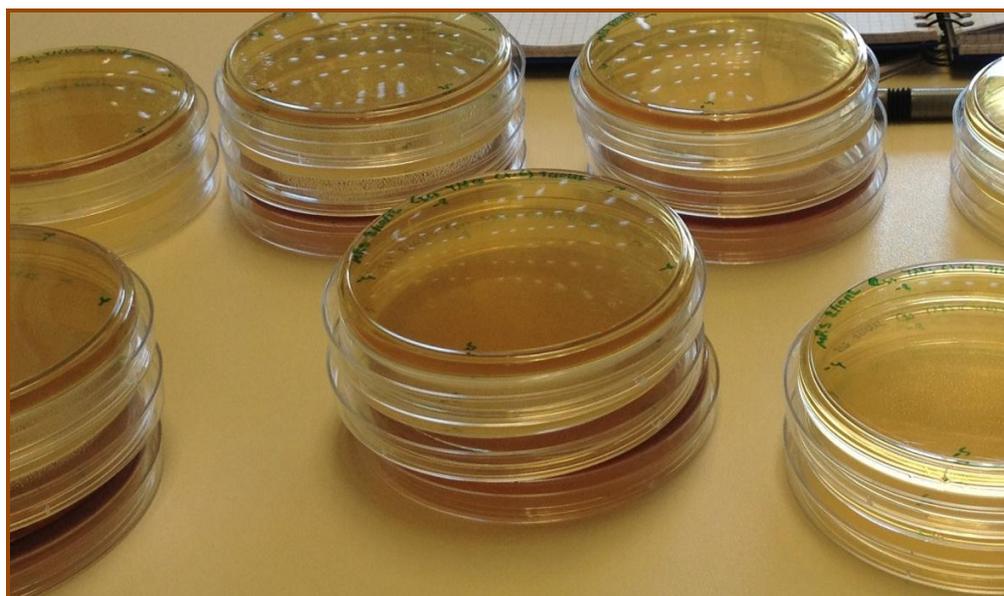
- Restoration of the altered microbiota or preservation of a healthy microbial balance with probiotics could protect against pathogen invasion and/or colonisation, as well as help improve gut health and well-being.
- pH-controlled faecal batch cultures allow determination of the fermentability of various substrates in the intestinal lumen. Short chain fatty acids and lactate are the main products arising from the microbial fermentation of carbohydrates.
- The adhesion of lactic acid bacteria to the intestinal mucosa influences their interaction with the host and the microbiota. Hydrophobicity could be a good indicator to preselect strains with adhesive character. Therefore, the combination of these models gives a more realistic idea of the complex conditions of the colon, addressing for intestinal lumen and epithelial barrier.
- *L. rhamnosus* GG is a species widely used as adjunct culture in functional dairy products, based on attributed health-promoting benefits.

Therefore, the aims of the present study were:

- ✓ To investigate hydrophobic character and ability to adhere *in vitro* to Caco-2 cells of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG.
- ✓ To subject *L. plantarum* C4 to *in vitro* pH-controlled anaerobic faecal batch cultures to determine changes in the composition of faecal bacteria, in comparison with *L. rhamnosus* GG. Evaluation of the effects upon major groups of the microbiota and levels of short chain fatty acids over 24 h.



### 3. MATERIAL AND METHODS





### 3.1. Materials

12-well tissue culture plates (Corning, Kennebunk, ME, USA).

5890 Series II Gas Chromatography system (HP, Crawley, West Sussex, UK) fitted with a NukoITM Capillary Column (30 m × 0.53 mm × 1.0 µm, SUPELCOTM Analytical, UK) and flame ionisation detector.

Agilent ChemStation software (Agilent Technologies, Oxford, UK).

Anaerobic chamber, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> and 80% N<sub>2</sub> (Don Whitley Scientific LTD, Shipley, West Yorkshire, UK).

Cryobank cryogenic beads (Prolab Diagnostics, UK).

Filters for sterilisation, 0.22 µm Millex® - GS (Merck Millipore Ltd., Cork, Ireland).

GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, LaJolla, CA, USA).

ISO20 oven (Grant Boekel).

Nikon E400 Eclipse microscope (Nikon Instruments Inc., New York, USA).

Nikon microscope (Kingston Upon Thames, UK).

pH controller (Fermac 260; Electrolab, Tewkesbury, UK).

Spectrophotometer BioMate 3 (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA).

Stomacher (Seward, Worthing, UK).

Teflon- and poly-L-lysine-coated, six-well (10 mm diameter each) slides (Tekdon, Myakka City, FL).

### 3.2. Chemicals

1% non-essential amino acid solution (Lonza, Slough, UK).

40, 6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 50 ng/µL (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Antifade reagent, polyvinyl alcohol mounting medium with DABCOTM antifading (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Bile salts (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK).

De Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS-broth) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK).

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), pH 7.2, without Ca and Mg (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

FISH probes commercially synthesised and 5'-labelled with fluorescent dye (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Foetal bovine serum (Lonza, Slough, UK).

Fructooligosaccharides (FOS) (95% oligosaccharide, β(2-1)-fructan; 60% glucose-fructose, 40% fructose, degree of polymerization, 3-10) (BENEIO GmbH, Germany).

Haemin solution (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Hexadecane (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

*L. plantarum* selective media (LPSM).

L-cysteine (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

NaCl (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Phosphate-buffered saline (PBS) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK).

Resazurin solution (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Trypsin-(ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA solution (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Tween 80 (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

Vitamin K (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

$\alpha$ -cellulose (Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

### 3.3. Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains used in this study were *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103). Strains were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  in 15% (w/w) glycerol Cryobank cryogenic beads. Plates of MRS agar for *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum* selective media (LPSM) agar for *L. plantarum* C4 were inoculated from stock culture collections and both probiotics were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  under anaerobic conditions in an anaerobic chamber.

After incubation, Bijou bottles containing 10 mL of MRS-broth were then inoculated with one colony from each plate. The cultured broths of probiotics were incubated for 24 h under the same conditions as previously described.

### 3.4. Bacterial growth curve determination

Bacterial growth curve assays with *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG were carried out in order to establish the specific bacteria growth curve of each strain to know their exponential growth phase and the precise correspondence between optical density at 600nm ( $\text{OD}_{600}$  units) and cfu in broth cultures at determined times.

The first day, a colony was picked from a plate, transferred into a MRS-broth hungate tube and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. The second day 0.1 mL of this was inoculated into new 9 mL MRS-broth, mixed and determined the resulting  $\text{OD}_{600}$  of the inoculated cultures. Then the OD of the cultures was read at different times (2h, 4h, 6h, 10h, 24h).

Plating in Petri dishes was done also at those times. For this purpose, 100  $\mu\text{L}$  of culture from the hungate tube were used to prepare serial dilutions (-1 to -8) with 900  $\mu\text{L}$  of PBS, 20  $\mu\text{L}$  of the dilutions were plated out in LPSM and MRS agar in triplicates and bacteria were allowed to grow in anaerobic cabinet for 24-48 h. Finally, the colonies were counted and the mean for each plate was calculated. The results were represented in 2 graphs:

- Graph of the  $\text{OD}_{600}$  of the cultures (Y axis) versus time (h) (X axis).
- Graph with the log data from the colonies counted (Y axis) versus time (h) (X axis), taking in account the number of colonies (n), the 20  $\mu\text{L}$  added to each

quadrant (x 50) and the dilution factor used (d). Thus, these results were expressed as log cfu/mL and were calculated using the following equation:

$$\log \text{ cfu/mL} = n \times 50 \times d$$

The linear phases of these curves represent their exponential or log phases.

This experiment was carried out in triplicate and for each biological replicate, two technical reports were used.

### 3.5. Tissue culture assays

#### • Caco-2 cell culture

The human adeno-carcinoma Caco-2 ECASS 86010202 cell line was obtained from ECACC. The routine culture of Caco-2 was performed according to Deepika et al. (2009) to ensure full differentiation. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum, 1% mixture of penicillin-streptomycin solution, and 1% non-essential amino acid solution, at 37°C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The culture medium was changed every other day; spent medium was removed and fresh supplemented medium was added.

#### • Probiotic adhesion to Caco-2 cells

Twenty-one day old, fully differentiated cells, cultured in 12-well tissue culture plates, were used for the cell adhesion experiments (Deepika et al., 2009). One day before adhesion assays, the spent medium was replaced with DMEM supplemented with non-essential amino acids and foetal bovine serum, without antibiotics.

On the day of the experiment, the monolayer was washed twice with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), in order to remove all traces of the medium. The Caco-2 cells counted were at around 4 x 10<sup>5</sup> cells/mL.

*L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG were cultured in MRS-broth for 24 h at 37°C under anaerobic conditions. The cultured broths were centrifuged (5000 g for 10 min, 4°C), and cells washed and re-suspended in DPBS (10<sup>8</sup> cfu/mL). One millilitre of bacterial suspension was added to each well and the plates were incubated for 60 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

After incubation, the DPBS containing unbound bacteria was removed from the wells; the wells were further washed with 1 mL of DPBS. These two fractions were pooled together. Consequently, the bacteria attached to the Caco-2 cells were detached by trypsinisation. One millilitre 0.25% trypsin-EDTA solution was added to each well and the plates incubated for 15 min at room temperature. The cells were detached by mechanical stirring and repeatedly, but gently, aspirated to make a homogeneous suspension.

Numbers of probiotic cells (bound and unbound) were determined by preparing serial dilutions with PBS  $10^{-2}$ - $10^{-8}$  and diluted samples were plated out onto MRS and LPSM agar and incubated anaerobically for 24-48 h at 37°C. Bacterial cells added to each well of the plates were also quantified. Furthermore, to check the consistency of the results, numbers of bacteria bound to the Caco-2 cells were also determined by subtracting the unbound bacteria numbers from the total number of bacteria added to wells. Results were expressed as cfu/mL.

This experiment was carried out in triplicate and for each biological replicate, two technical reports were used.

### **3.6. Physicochemical assays: bacterial adhesion to hydrophobic solvent**

The different hydrophobic characteristics of the cell surface of both strains were evaluated by the microbial adhesion to hexadecane (MATH) assay, previously described by Deepika et al. (2009).

Probiotic strains were cultured in MRS-broth for 24 h at 37°C. The cultured broths were centrifuged (5000 g for 10 min, 4°C), and cells washed twice in PBS before suspending in 10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . The pH of the bacterial suspension was adjusted to 3 with 1 mol/L HCl to minimise the electrostatic interactions between bacterial cells and hexadecane, and the initial absorbance ( $A_0$ ) at 600 nm adjusted to 0.8.

Two millilitres of bacterial suspension was then mixed with the same volume of hexadecane in a 10 mL syringe. The mixture was vortexed for 1 min and then left undisturbed for 20 min to allow complete phase separation. After equilibration, the lower aqueous phase was removed carefully, in order not to disturb the interfacial equilibrium, into plastic spectrophotometry cuvettes and absorbance at 600 nm ( $A_1$ ) measured.

Strains adhering well (>80%) to the hydrocarbons are considered to be hydrophobic and strains adhering poorly (<40%) are considered to be hydrophilic. The percentage of adhesion (% adhesion) was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Adhesion to hexadecane} = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

This experiment was carried out in triplicate and for each biological replicate, two technical reports were used.

### 3.7. Batch cultures

#### • Probiotics culture preparation

*L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG were cultured in MRS-broth for 24 h at 37°C under anaerobic conditions. Cells were prepared for addition to the fermenter vessels by centrifuging at 5000 *g* for 10 min. The supernatant was removed and cells washed and re-suspended in PBS and adjusted to an OD<sub>600</sub> corresponding to 10<sup>8</sup> cfu/mL.

#### • Faecal sample preparation

The faecal samples were obtained fresh at the premises of the department from three healthy human donors (one man, two women; average 27±3.3 years of age, omnivores) who were free from known metabolic and gastrointestinal disorders. None of the volunteers had taken antibiotics during the 6 months leading to the study.

Samples were collected, kept in anaerobic cabinet and used within 15 min of collection. A 1/10 w/w dilution in PBS was prepared and homogenised using a stomacher for 2 min at 460 paddle-beats per min.

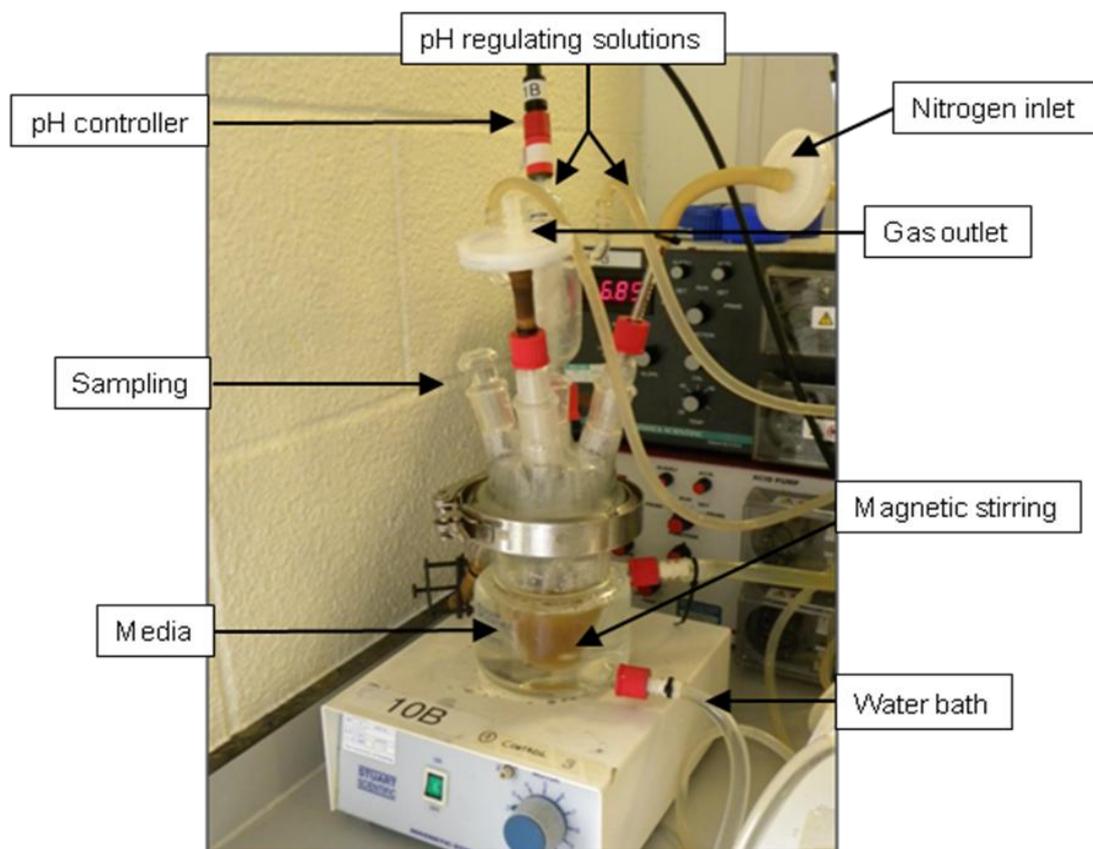
#### • *In vitro* batch cultures studies

Sterile stirred batch culture fermentation vessels (100 mL working volume) were prepared and aseptically filled with 45 mL of sterile basal colonic growth medium (Martín-Peláez et al., 2008). This medium contained 2 g/L peptone water, 2 g/L yeast extract, 0.1 g/L NaCl, 0.04 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2 mL/L Tween 80, 0.05 g/L haemin solution, 10 µL/L vitamin K, 0.5 g/L L-cysteine HCl, 0.5 g/L bile salts. The culture medium was adjusted to pH 7.0 and 4 mL/L of 0.025% (w/v) resazurin solution added before autoclaving as an indicator of anaerobiosis.

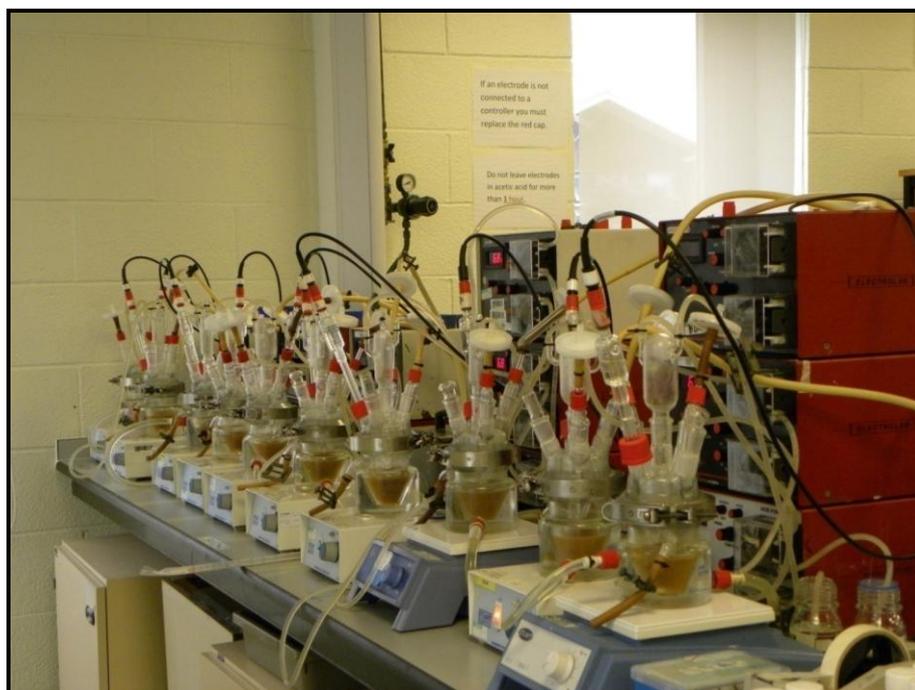
Once in the fermentation vessels, sterile medium was maintained under anaerobic conditions by sparging the vessels with O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub> (15 mL/min) overnight. Temperature was held at 37°C using a circulating water bath and pH values controlled between 6.7 and 6.9 using an automated pH controller which added acid or alkali as required (0.25 M HCl and 0.25 M NaOH).

Seven gently stirred pH-controlled batch fermenters were run in parallel. Two vessels were inoculated with 1 mL of a suspension of *L. plantarum* C4 (10<sup>8</sup> cfu/mL), in which one of the following carbohydrates was added: FOS or α-cellulose (cellulose) (1% w/v). Another set of two vessels were inoculated with 1 mL of *L. rhamnosus* GG (10<sup>8</sup> cfu/mL), and FOS or cellulose (1% w/v) was added to each one. Two extra vessels were also included as positive and negative controls, one of them containing only FOS and the other one containing only cellulose, respectively. A control with neither probiotics nor carbohydrates added (control) was also included.

The experiment was performed in triplicate, using one faecal sample given by a different donor for each run of seven batch fermenters. The probiotics and carbohydrates were added to each vessel just before the addition of 5 mL (10% w/w) of fresh faecal slurry prepared as described above. Batch cultures were conducted for 24 h, and 4 mL samples obtained from each vessel at 0, 5, 10 and 24 h for analysis of bacterial populations by FISH and for SCFA analyses using gas chromatography. Pictures of batch culture vessels are shown in figures 38 and 39.



**Figure 38.** A batch culture vessel showing important components and ports necessary to run single stage batch culture fermentations.



**Figure 39.** Batch culture vessels set up running in parallel.

### • Enumeration of bacterial populations by FISH analysis

FISH analysis was performed as described by Martín-Peláez et al. (2008). Briefly, aliquots (375  $\mu\text{L}$ ) of batch culture samples were fixed in three volumes of ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde for 4 h at 4°C. They were then centrifuged at 13,000  $g$  for 5 min and washed twice in 1 mL of sterile PBS. The cells were again pelleted by centrifugation and re-suspended in 150  $\mu\text{L}$  of sterile PBS, to which 150  $\mu\text{L}$  of ethanol was added. Samples were then vortexed and stored at -20°C until used in hybridisations.

For the hybridisations, 20  $\mu\text{L}$  of each sample was pipetted onto teflon- and poly-L-lysine-coated, six-well slides. The samples were dried onto the slides at 46°C for 15 min and afterwards dehydrated in an alcohol series (50%, 80% and 96%, 3 min each). Ethanol was allowed to evaporate from the slides before the probes were applied to the samples.

A probe/hybridisation buffer mixture (5  $\mu\text{L}$  of a 50 ng/ $\mu\text{L}$  stock of probe plus 45  $\mu\text{L}$  of hybridisation buffer) was applied to the surface of each well. Hybridisations were performed for 4 h in an ISO20 oven. For the washing step, slides were placed in 50 mL of wash buffer containing 20  $\mu\text{L}$  of DAPI (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) for 15 min. They were then briefly washed (2-3 s) in ice-cold water and dried under a stream of compressed air. Five microlitres of antifade reagent were added to each well and a cover slip applied. Slides were stored in the dark at 4°C (for a maximum of 3 days) until cells were counted under a Nikon E400 Eclipse microscope. DAPI slides were visualized with the aid of a DM 400 filter and probe slides with the aid of a DM 575 filter. Numbers of specific bacteria were determined using the following equation:

$$\text{DF} \times \text{ACC} \times 6732.42 \times 50 \times \text{DF}_{\text{sample}}$$

Where,

DF = dilution factor (300/375 = 0.8)

ACC = average cell count of 15 fields of view

6732.42 = area of the well divided by the area of the field of view

50 = factor that takes the cell count back to per millilitre of sample

DF<sub>sample</sub> = dilution of sample used with a particular probe or stain

All probes were commercially synthesised and 5'-labelled with the fluorescent dye. Table 35 gives the details of the probes used in this study.

**Table 35.** FISH oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Target bacterial group/species	Target sequence (5'-3')	Hybridisation/ Washing T (°C)	References
<b>Bif164</b>	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CATCCGGCATTACCACCC	50-50	Langendijk et al. (1995)
<b>Lab158</b>	<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> spp.	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	50-50	Harmsen et al. (1999)
<b>Bac303</b>	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	CCAATGTGGGGGACCTT	46-48	Manz et al. (1996)
<b>Chis150</b>	<i>Clostridium histolyticum</i> group clusters I, II	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	50-50	Franks et al. (1998)
<b>Erec482</b>	<i>Clostridium</i> clusters XIVa+b	GCTTCTTAGTCARGTACCG	50-50	Franks et al. (1998)
<b>Eub338 I<sup>a</sup></b>	Most bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	46-48	Daims et al. (1999)
<b>Eub338 II<sup>a</sup></b>	Most bacteria	GCAGCCACCCGTAGGTGT	46-48	Daims et al. (1999)
<b>Eub338 III<sup>a</sup></b>	Most bacteria	GCTGCCACCCGTAGGTGT	46-48	Daims et al. (1999)

<sup>a</sup> These probes were used in equimolar concentrations (50 ng/mL). Formamide (35%) was included in the hybridisation buffer.

#### • SCFA analysis

Samples were taken from the batch culture vessels at each time point and cell-free culture supernatants obtained by centrifugation of 1 mL at 13,000 *g* for 10 min followed by filter sterilisation (0.22 µm) to remove all particulate matter.

SCFA was measured by gas chromatography (Vogt et al., 2004; Fernandes et al., 2011). 1 µL of each sample was injected into a GC system fitted with a capillary column and flame ionisation detector. The carrier gas, helium, was delivered at a flow rate of 14 mL/min. The head pressure was set at 10 psi with split injection. Run conditions were: initial temperature 60°C, 1 min; + 20 °C/min to 145°C; + 4°C/min to 200°C, hold 25 min.

Peaks were integrated using Agilent ChemStation software and SCFA content quantified by single point internal standard method. Peak identity and internal response factors were determined using a range from 0.32 to 50 mM calibration cocktail including acetic, propionic, iso-butyric, butyric, iso-valeric, valeric and caproic acids.

### **3.8. Statistical analysis**

Bacterial counts and SCFAs were analysed using 2-way ANOVA with *Bonferroni* post-tests plus least significant difference ( $p < 0.05$ ), to compare different vessels at the same time points. Paired *t*-tests were applied to assess the same treatment at different time points.

Adhesion counts and hydrophobicity data were analysed by ANOVA with two-tailed distribution. Significant differences were defined at  $p < 0.05$ .

All analyses were performed using GraphPad Prism 5.0.



## 4. RESULTS AND DISCUSSION

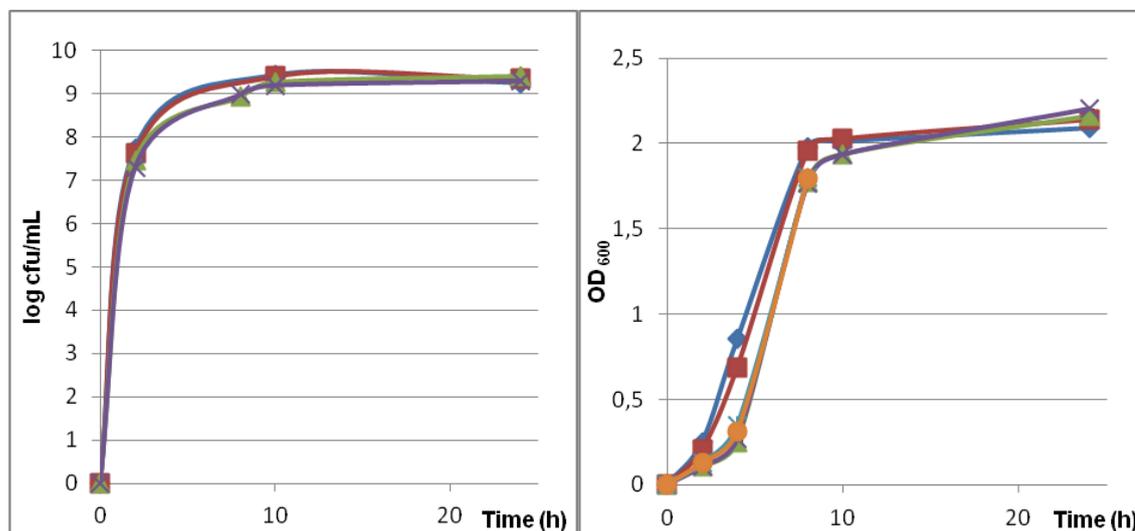




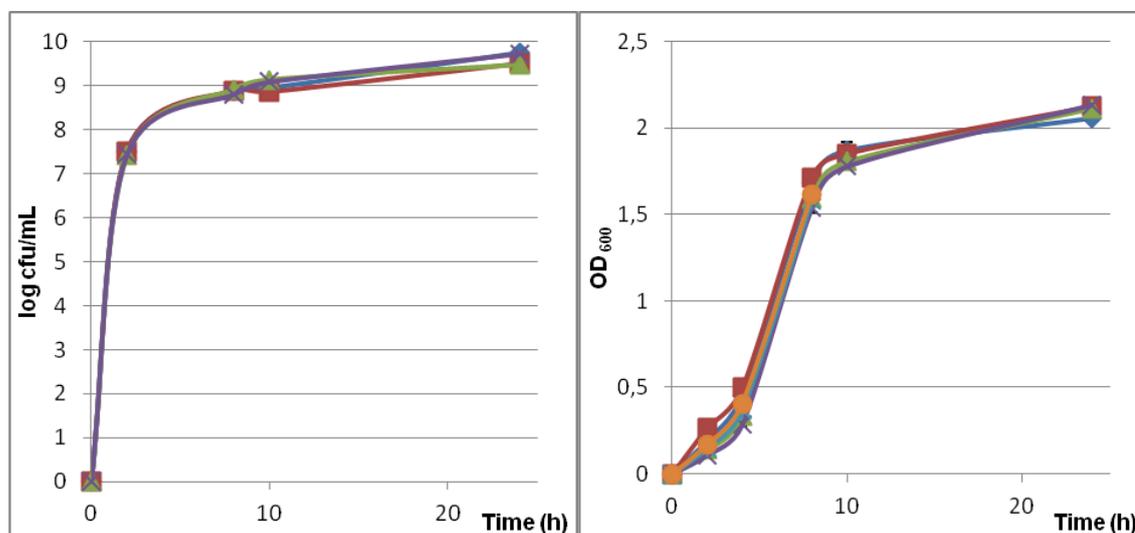
#### 4.1. Bacterial growth curve determination

Figure 40 shows the growth curves of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG cells.

##### *L. plantarum* C4



##### *L. rhamnosus* GG



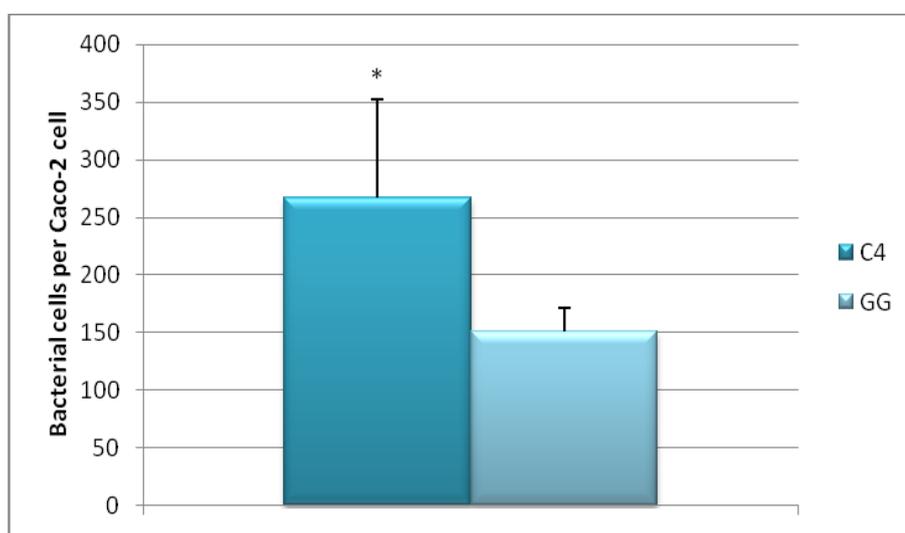
**Figure 40.** Growth curves of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG expressed as log cfu/mL and optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>)

## 4.2. Probiotic adhesion to Caco-2 cells

Probiotics may be applied in specific diseases based on their characteristics and health-promoting effects. The capacity of lactobacilli to adhere *in vitro* to epithelial cells is considered one of the main criteria in the selection of new probiotic microorganisms (Collado et al., 2007). It is important to study the physicochemical properties of the bacterial surfaces, as it is possible that adhesion involves a multistep process, in which non-specific interactions and specific ligand/receptor interactions are playing a role (Deepika et al., 2009). The adhesion of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG *in vitro* was assessed using Caco-2 cells, which is the most commonly used model to assess the adhesion of microorganisms to human intestinal cells (Blum et al., 1999; Lee et al., 2000; Gueimonde et al., 2006).

Figure 41 presents the adhesion abilities of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG cells to a Caco-2 intestinal epithelial cell line model. The results showed that for *L. plantarum* C4 the adhesion reached a mean value of  $266.67 \pm 85.50$  bacterial cells per Caco-2 cell. This microorganism was seen to be significantly more adhesive than *L. rhamnosus* GG ( $151.25 \pm 20.50$  cells/Caco-2) ( $p < 0.05$ ).

Bound cells total values were  $1.07 \times 10^8 \pm 3.42 \times 10^7$  and  $6.05 \times 10^7 \pm 8.20 \times 10^6$  for *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG, respectively.



**Figure 41.** Adhesion of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG cells to Caco-2 cells, expressed as the number of adhered bacterial cells per Caco-2 cell. \* $p < 0.05$ .

Thus, our strain showed a better adhesion to epithelial cells, considered one of the main criteria in the selection of potential probiotic microorganisms (Collado et al., 2007). Many different values for lactobacilli adhesion have been reported, ranging from between 10 and 160 bacterial cells per Caco-2 cell (Lee et al., 2000; Gopal et al., 2001; Delgado et al., 2007). The differences between the literature values may reflect bacterial cells with different physiological states, such as cells grown in different growth media and conditions, or cells taken at different time points.

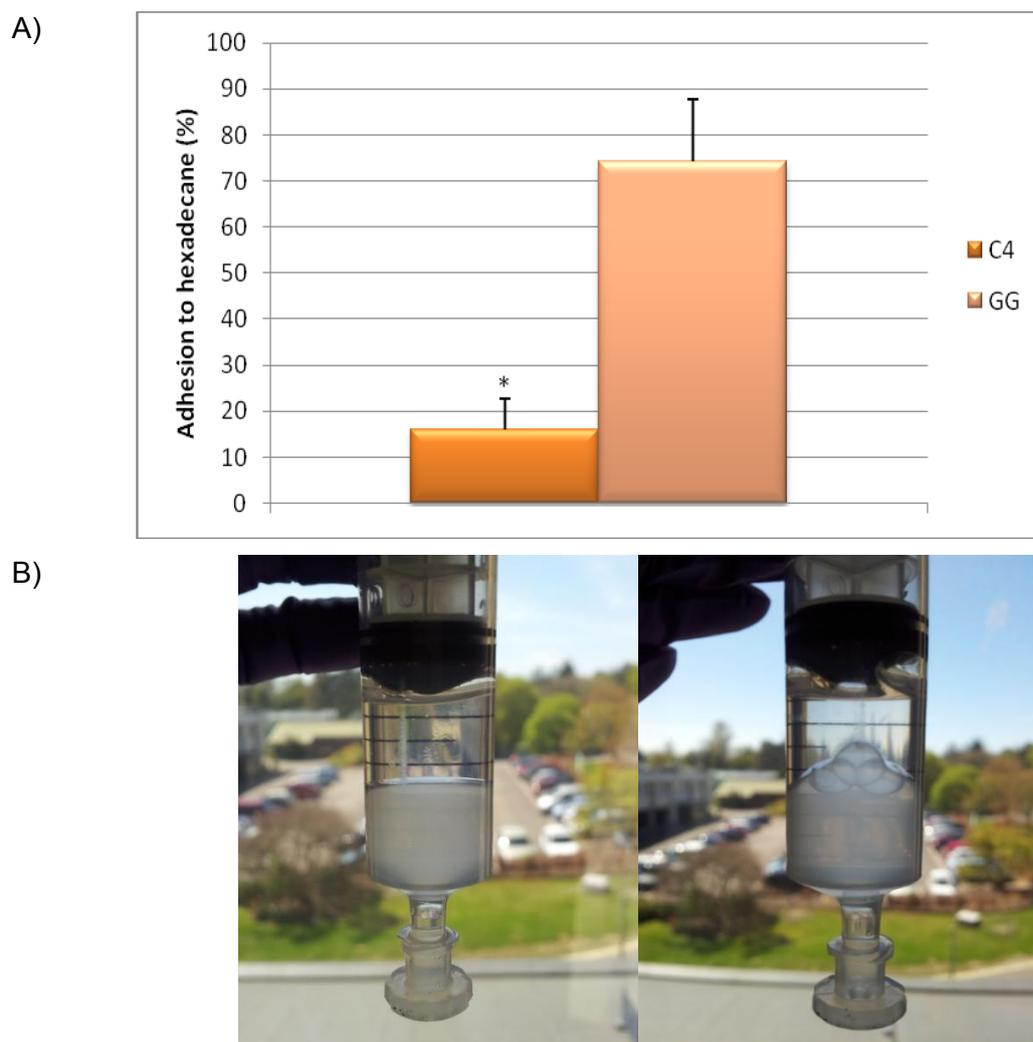
### 4.3. Bacterial adhesion to hydrophobic solvent

A correlation between hydrophobicity and adhesion to intestinal cells has been previously suggested (Del Re et al., 2000; Ehrmann et al., 2002; Kos et al., 2003). Hydrophobicity is responsible for the initial weak and reversible interaction of bacteria adhesion that precedes binding interactions between microorganisms and their target cells mucosal surface (Abraham et al., 1999). However, some controversy exists in this field and they cannot be always correlated (Zárate et al., 2002; Vinderola et al., 2004).

Figure 42 shows the results from the MATH assay for *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG cells. It can be observed that adhesion to hexadecane was low for *L. plantarum* C4 ( $16.08 \pm 6.73\%$ ), whereas the values for *L. rhamnosus* GG were significantly higher ( $p < 0.001$ ), reaching a mean value of  $74.29 \pm 13.59\%$ . These results showed a hydrophilic and hydrophobic character for *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG, respectively.

Regarding these results, we did not find a positive correlation between hydrophobicity and bacterial adhesion, as the most hydrophilic probiotic (*L. plantarum* C4) adhered to Caco-2 significantly better than the most hydrophobic one (*L. rhamnosus* GG) (figures 41 and 42). Therefore, the results of this work suggested the same conclusions as the latter authors.

The lack of correlation between the capacity for adhesion and hydrophobicity has already been observed, indicating that this property does not play an important role in the mechanism of immunostimulation (Vinderola et al., 2004). In addition, it has been reported that a decrease in hydrophobicity after trypsin treatment does not necessarily lead to a drop in the adhesion, this could be attributed to the presence of anionic compounds or adhesive components, which are hydrophilic (Deepika et al., 2009).



**Figure 42.** A) Hydrophobicity of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG cells expressed as percentage of bacteria adsorbed by hexadecane as measured by the MATH assay. \* $p < 0.001$ . B) Adhesion to hexadecane of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG in the syringe, respectively.

Although further research is required in order to identify which compound and factors can influence the adhesion of the lactobacilli to intestinal cells, in this study *L. plantarum* C4 demonstrated hydrophilic character and fulfilled desirable adhesive properties.

#### 4.4. Batch cultures

Apart from the assays regarding the epithelial barrier, anaerobic batch culture experiments were carried out to investigate the capability of different probiotic treatments to modulate the human microbiota. The influence of the potentially beneficial strain *L. plantarum* C4 in a complex, competitive environment, representative of the distal colon, was studied. As a comparison, *L. rhamnosus* GG, a species widely used as adjunct culture in functional dairy products, was studied. The microorganisms were assessed for their abilities to influence the microbiota dynamics. To provide fermentable food sources, FOS and cellulose were additionally used as positive and negative controls, respectively. We used FISH to monitor quantitative changes in total bacterial numbers and counts of lactobacilli, bifidobacteria, bacteroides and clostridia. Furthermore, SCFA production during the incubations in the vessels containing the different treatments was also monitored.

To date, not many studies have investigated the effects of *L. plantarum* using *in vitro* batch culture studies. These models have been largely used to study the prebiotic effects of different substrates and also potential synbiotic combinations (Martín-Peláez et al., 2008; Saulnier et al., 2008; Ramnani et al., 2012). Here, *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG were each combined with FOS or cellulose.

##### • Modulation of bacterial populations by FISH analysis

*In vitro* modification of the faecal microbiota by *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG was monitored by FISH. The FISH probes used were chosen to enumerate numerically predominant groups of the faecal microbiota (*Bacteroides*, *Clostridium* clusters XIVa+b), groups considered beneficial for the host (*Bifidobacterium* or *Lactobacillus/Enterococcus* spp.) or potentially negative (*C. histolyticum* group), and Eub338 I-II-III to monitor total bacteria changes.

Figures 43, 44 and 45 show bacterial counts in control and probiotic-supplemented cultures. Trends to increases in all incubations were observed for bifidobacteria, but no significant changes were found, the highest number was found in the fermentations with *L. plantarum* C4 + FOS at 24 h ( $\log=8.96\pm 0.36$ ) (figure 43).

Regarding *Lactobacillus-Enterococcus* group, a decrease in fermentations with FOS was found at 24 h ( $p<0.05$ ), compared to 0 h. Comparing all treatments to the negative control, it was observed that Lab158 counts were significantly higher

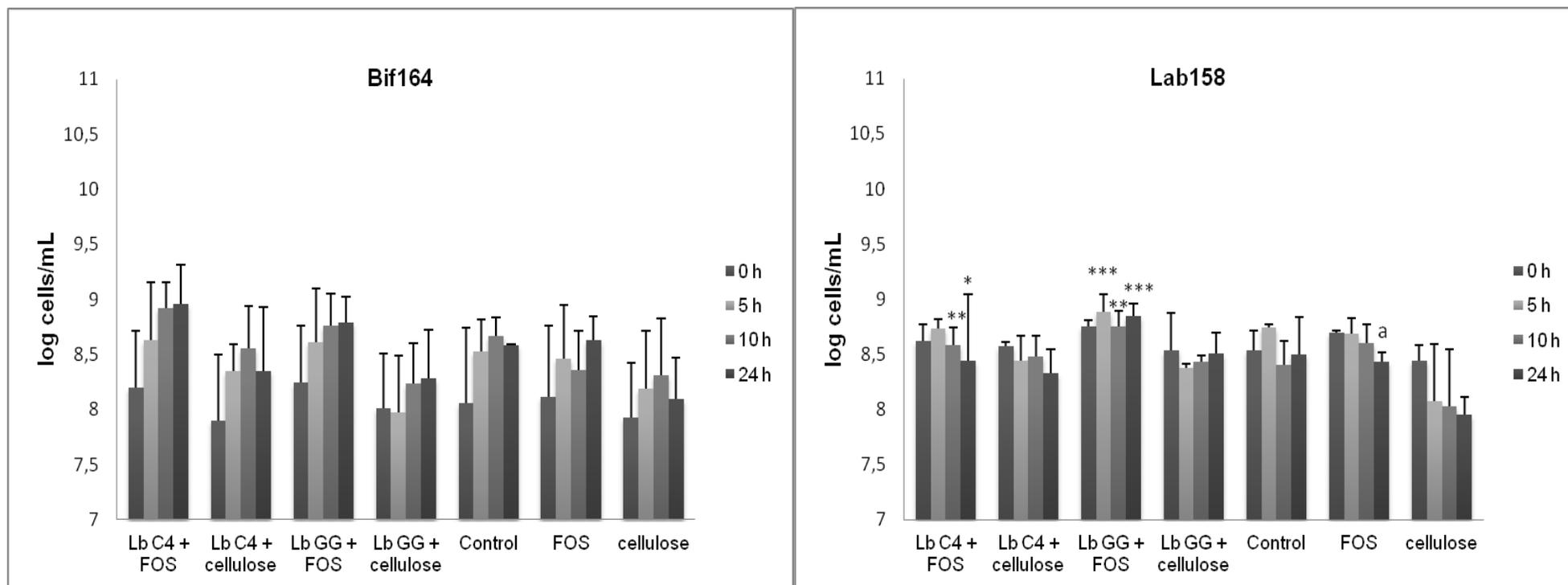
at time 5 h ( $p < 0.01$ ) and 10 h ( $p < 0.05$ ) in presence of *L. plantarum* C4 + FOS and at 5 h ( $p < 0.001$ ), 10 h ( $p < 0.01$ ) and 24 h ( $p < 0.001$ ) in the case of *L. rhamnosus* GG + FOS (figure 43).

*Bacteroides-Prevotella* group remained without significant variation throughout fermentation, except for an increase in the control at 24 h ( $p < 0.05$ ). The highest value was counted for the mixture *L. plantarum* C4 + FOS at 24 h, which promoted the growth of this group of microorganisms (from  $\log = 8.56 \pm 0.07$  to  $\log = 8.91 \pm 0.73$ ), although no significant differences were observed (figure 44).

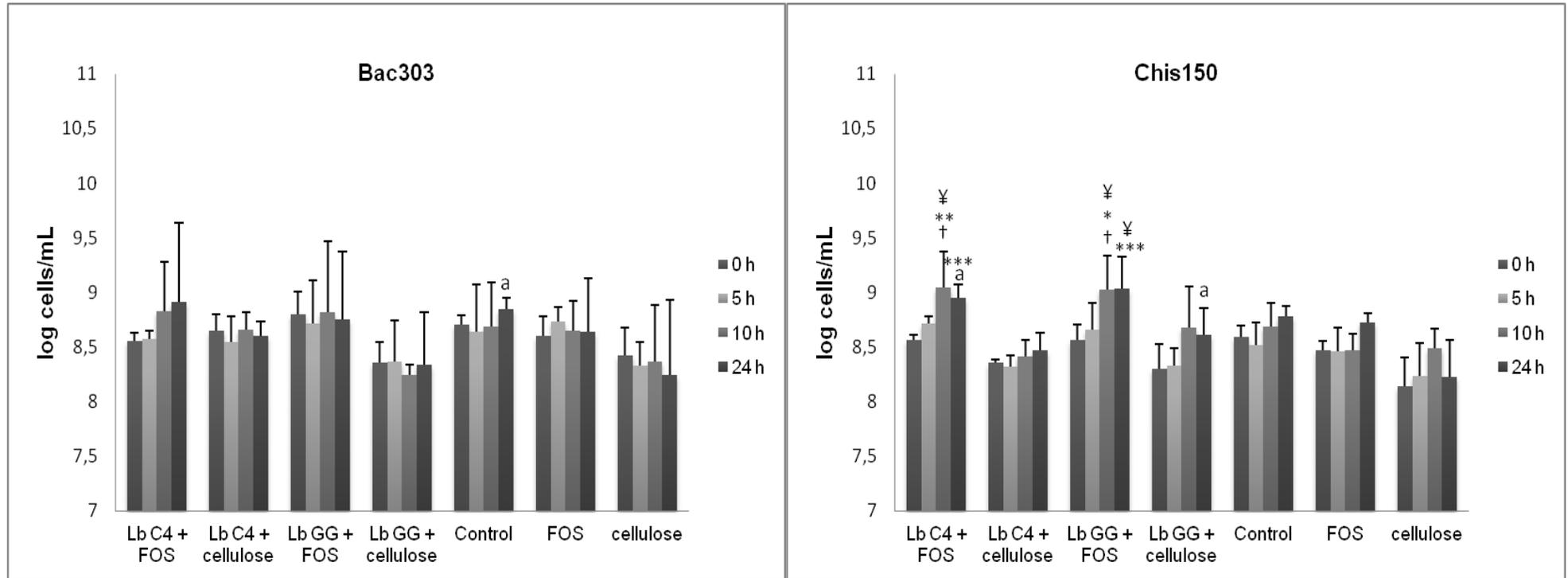
*Clostridium histolyticum* group increased significantly in vessels with *L. plantarum* C4 + FOS and *L. rhamnosus* GG + cellulose ( $p < 0.05$ ). This group displayed a similar behaviour in fermentations with probiotic + FOS; higher counts were found in both of them at 10 h ( $p < 0.01$ ) when compared to the positive control, and at 10 h and 24 h comparing to the negative control ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). Besides, significantly higher values were observed in vessels containing *L. plantarum* C4 + FOS (10 h) and *L. rhamnosus* GG + FOS (10 h and 24 h), with respect to *L. plantarum* C4 + cellulose ( $p < 0.01$ ) (figure 44).

Relating the *Clostridium* clusters XIVa+b group, no significant differences were observed. Counts showed a first decrease at 5 h, followed by an increase at 10 h in all vessels, with the exception of the negative control cultures. An insignificant increase also at 24 h was observed in fermentations with *L. plantarum* C4 + FOS and control (figure 45).

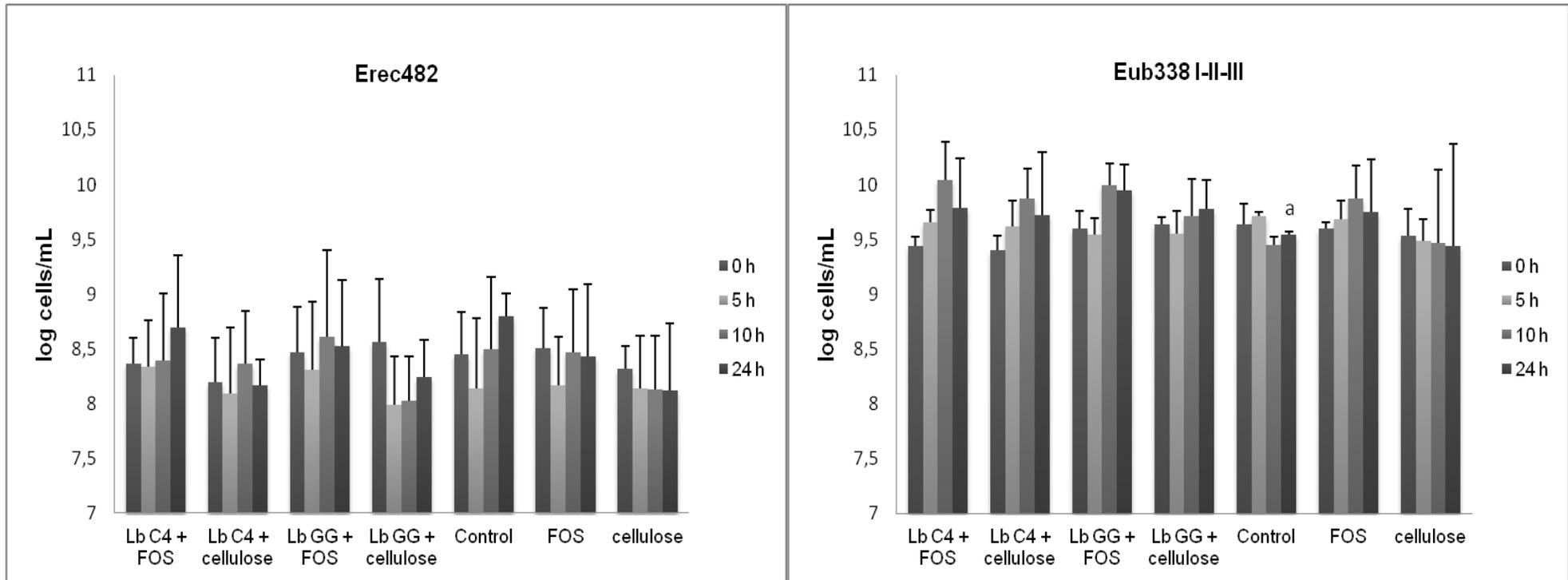
Finally, numbers obtained for total bacteria showed a similar behaviour with all probiotics and carbohydrates tested, they increased during batch culture fermentations. The maximum value of total bacteria was found in presence of *L. plantarum* C4 + FOS at 10 h, reaching a value of  $\log = 10.04 \pm 0.35$ . However, a decrease for the control at 24 h ( $p < 0.05$ ) was the only significant difference detected (figure 45).



**Figure 43.** Bacterial populations analysed by fluoresce in situ hybridisation in batch cultures containing different probiotics (n=3). Bif164: *Bifidobacterium* spp. Lab158: *Lactobacillus/Enterococcus* spp. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; significantly different from cellulose. <sup>a</sup> $p < 0.05$ ; significantly different compared to 0 h within the same substrate.



**Figure 44.** Bacterial populations analysed by fluoresce in situ hybridisation in batch cultures containing different probiotics (n=3). Bac303: *Bacteroides-Prevotella* group. Chis150: *C. histolyticum* group clusters I, II. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; significantly different from cellulose. † $p < 0.01$ ; significantly different from FOS. ‡ $p < 0.01$ ; significantly different from Lb C4 + cellulose. <sup>a</sup> $p < 0.05$ ; significantly different compared to 0 h within the same substrate.



**Figure 45.** Bacterial populations analysed by fluorescence in situ hybridisation in batch cultures containing different probiotics (n=3). Erec482: *Clostridium* clusters XIVa+b. Eub338 I-II-III: Most bacteria. <sup>a</sup>p<0.05; significantly different compared to 0 h within the same substrate.

Although higher values of *C. histolyticum* were found in vessels with probiotic + FOS, an increase in this group occurred in all the fermentations. It has been reported that this fact could be attributed to factors such as culture conditions rather than to a specific effect mediated by the tested probiotics (Salazar et al., 2009).

Amongst the other groups analysed by FISH, our results showed that *L. plantarum* C4 + FOS and *L. rhamnosus* GG + FOS clearly stimulated the growth of *Lactobacillus/Enterococcus*, which was not seen with FOS alone, therefore the addition of the *Lactobacillus* combined with the FOS lead to enhanced growth. This fact might have been expected, as it had been previously observed higher levels of beneficial members of the microbiota due to the effect of synbiotics, in comparison with prebiotics alone (Saulnier et al., 2008).

Besides, fermentations with *L. plantarum* C4 + FOS showed increases over the time and reached the highest values at 10 and 24 h in *Bifidobacterium* and *Bacteroides* groups. It should be taken into account that no totally specific probe targeting most species of *Lactobacillus* genus but discarding enterococci is currently available; in spite of that, Lab 158 was chosen for the present work on the basis of its good performance with common intestinal lactobacilli (Harmsen et al., 1999). Therefore, as the Lab158 probe enumerates both lactobacilli and enterococci, a concomitant increase of enterococci should not be discarded from our results.

Some probiotics do not increase in mixed culture studies possibly because they do not compete well with the rest of the gut microbiota or the numbers added are small to be detected by FISH, whereas with the prebiotic further enhancement was enabled. That could be why an increase in *Lactobacillus/Enterococcus* was not found in vessels with *L. plantarum* C4 + cellulose. For this reason, the use of prebiotics has been introduced to target indigenous beneficial bacteria already established in the host (Gibson et al., 1995). Some authors have confirmed that FOS is generally a well-used substrate by some lactobacilli (Kaplan et al., 2003). However, no major differences were seen when investigating the effects of FOS fermentation alone.

We have shown that as synbiotics there is a superior efficacy, as compared to the prebiotic component alone, to modulate the faecal microbiota toward a purportedly healthy composition. This is in agreement with other studies, which compared the

effects of synbiotics and prebiotics, the major difference being an increase in *Lactobacillus/Enterococcus* with the synbiotics.

In addition, probiotics added were able to be stimulated by the prebiotics, although it should be taken into account that enhancement of probiotic growth by the prebiotic in mixed culture has been reported to be strain specific (Ramette et al., 2007; Saulnier et al., 2008). From these results, it appears that fermentation of the synbiotics could be selective and affect *Lactobacillus/Prevotella*, one of the major members of the microbiota considered as beneficial.

#### • SCFA production in batch cultures

Table 36 illustrates the SCFA concentrations in presence of *L. plantarum* C4 and *L. rhamnosus* GG with FOS or cellulose. Marked differences were found between donors with respect to levels of SCFA attained in faecal cultures. Because of this, no significant differences were found between time points and only few differences were observed when comparing treatments in terms of their effects on levels of some SCFA.

In general, acetic acid production in faecal cultures occurred during early stages of fermentation and increased levels were detected at time 5 h in all the fermentations, except for the vessels containing *L. rhamnosus* GG, but no significant differences were detected. In general, acetate was produced in the greatest amount, with the highest value found in the incubations with *L. plantarum* C4 + FOS ( $12.67 \pm 11.61$  mM).

Acetic acid is formed by many anaerobic bacteria from the human gut, being a principal end product of carbohydrate fermentation by bifidobacteria (Macfarlane et al., 1997; Salazar et al., 2009). In faecal cultures with *L. plantarum* C4 + FOS, the increase in lactobacilli counts correlated with the rapid increase in acetic acid during early stages of fermentation, although no significant differences were detected for this SCFA.

Regarding propionic acid, at time 0, concentrations ranged between 0.98-4.68 mM. After the fermentations, the maximum value was observed in the control at 10 h, followed by the fermenters inoculated with *L. plantarum* C4 + FOS ( $2.20 \pm 1.87$  mM) and *L. rhamnosus* GG + FOS ( $2.21 \pm 0.39$  mM).

*Bacteroides* and *Prevotella* are among the predominant genera in the gut of mammals (Hooper et al., 2012). They are versatile saccharolytic microorganisms

and the major part of polysaccharide digestion that occurs in the human large intestine is carried out by members of the genus *Bacteroides* (Salyers et al., 1984). Therefore, the significant increase in *Bacteroides*, a group producing variable amounts of propionate depending on the culture conditions (Macfarlane et al., 1997), in the control could provide a probable rationale for the trend to increase of propionic acid in these fermentations. However, these results were not expected in control vessels, and it has not been reported by other authors so far.

Although significant differences were not observed, there was a similarity between treatments in terms of their effects on levels of butyric, valeric and caproic acids. High values were found at 0 h, afterwards the maximum concentrations were found in vessels containing the mixture *L. plantarum* C4 + FOS or *L. rhamnosus* GG + FOS at 5 h (butyric acid=1.26±1.41, valeric acid=0.81±1.09, caproic acid=0.88±1.20). In general, the levels of these three acids decreased in all the fermentations over the time.

Finally, considering the branched chain fatty acids iso-butyric and iso-valeric acids, as occurred with the other SCFA, we detected high levels at time 0, the maximum values during the fermentations were found again in vessels containing *L. plantarum* C4 + FOS at 5 h (iso-butyric=0.37±0.37 mM, iso-valeric=0.44±0.54 mM), without significant differences. A significantly higher value of iso-butyric acid was found in vessels containing *L. plantarum* C4 + FOS at 10 h, compared to fermentations with *L. rhamnosus* GG + cellulose ( $p<0.05$ ).

Acetic acid was the most abundant SCFA, followed by propionic acid and butyric acid. Largest concentrations at 5 h were generally found in the fermenters with *L. plantarum* C4 + FOS.

**Table 36.** SCFA concentrations in pH-controlled batch cultures at 0, 5, 10 and 24 h (n=3).Lb C4: *L. plantarum* C4. Lb GG: *L. rhamnosus* GG.

Treatment	Time point	Mean SCFA concentration (mM) in treatment ( $\pm$ SD)						
		Lb C4 + FOS	Lb C4 + cellulose	Lb GG + FOS	Lb GG + cellulose	Control	FOS	cellulose
Acetic	0h	7.05 $\pm$ 9.21	1.99 $\pm$ 3.11	6.51 $\pm$ 8.54	3.40 $\pm$ 2.92	3.21 $\pm$ 4.42	2.10 $\pm$ 3.20	3.70 $\pm$ 3.14
	5h	12.67 $\pm$ 11.61	5.42 $\pm$ 5.40	3.62 $\pm$ 5.08	1.72 $\pm$ 2.58	8.42 $\pm$ 6.71	6.85 $\pm$ 6.43	3.87 $\pm$ 4.05
	10h	3.26 $\pm$ 4.53	2.04 $\pm$ 3.08	2.44 $\pm$ 3.58	1.51 $\pm$ 1.88	3.19 $\pm$ 4.39	6.51 $\pm$ 5.92	1.57 $\pm$ 2.00
	24h	0.32 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.08	0.36 $\pm$ 0.18	0.60 $\pm$ 0.63	0.35 $\pm$ 0.08	4.29 $\pm$ 6.52	0.35 $\pm$ 0.23
Propionic	0h	4.68 $\pm$ 4.23	1.45 $\pm$ 1.61	2.98 $\pm$ 3.07	0.98 $\pm$ 0.94	4.44 $\pm$ 3.62	1.59 $\pm$ 1.68	1.39 $\pm$ 1.59
	5h	2.20 $\pm$ 1.87	1.71 $\pm$ 1.73	2.21 $\pm$ 0.39	0.94 $\pm$ 0.54	1.86 $\pm$ 0.94	1.84 $\pm$ 1.73	1.27 $\pm$ 1.49
	10h	1.31 $\pm$ 0.69	1.62 $\pm$ 1.29	1.51 $\pm$ 0.61	1.33 $\pm$ 0.80	2.91 $\pm$ 3.50	1.44 $\pm$ 0.90	0.96 $\pm$ 0.62
	24h	1.08 $\pm$ 0.42	2.15 $\pm$ 1.20	1.06 $\pm$ 0.81	1.15 $\pm$ 0.94	1.12 $\pm$ 0.83	1.98 $\pm$ 0.47	0.83 $\pm$ 0.49
Butyric	0h	3.47 $\pm$ 3.83	1.15 $\pm$ 1.43	2.04 $\pm$ 2.56	0.72 $\pm$ 0.78	3.38 $\pm$ 3.41	1.24 $\pm$ 1.51	1.11 $\pm$ 1.40
	5h	1.26 $\pm$ 1.41	0.86 $\pm$ 0.96	0.75 $\pm$ 0.55	0.43 $\pm$ 0.32	0.86 $\pm$ 0.67	0.94 $\pm$ 0.88	0.73 $\pm$ 0.85
	10h	0.27 $\pm$ 0.21	0.92 $\pm$ 1.01	0.30 $\pm$ 0.22	0.34 $\pm$ 0.31	0.24 $\pm$ 0.17	0.79 $\pm$ 0.62	0.51 $\pm$ 0.43
	24h	0.22 $\pm$ 0.30	1.03 $\pm$ 1.37	0.31 $\pm$ 0.39	0.41 $\pm$ 0.47	0.07 $\pm$ 0.03	1.13 $\pm$ 0.96	0.29 $\pm$ 0.36
Valeric	0h	2.70 $\pm$ 3.94	1.01 $\pm$ 1.58	1.74 $\pm$ 2.63	0.61 $\pm$ 0.94	2.39 $\pm$ 3.33	1.06 $\pm$ 1.65	0.97 $\pm$ 1.53
	5h	0.81 $\pm$ 1.09	0.46 $\pm$ 0.69	0.41 $\pm$ 0.46	0.18 $\pm$ 0.24	0.57 $\pm$ 0.64	0.52 $\pm$ 0.75	0.42 $\pm$ 0.64
	10h	0.11 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.35	0.11 $\pm$ 0.10	0.10 $\pm$ 0.11	0.12 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.27	0.16 $\pm$ 0.17
	24h	0.07 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.79	0.09 $\pm$ 0.14	0.11 $\pm$ 0.15	0.02 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.59	0.13 $\pm$ 0.20
Caproic	0h	2.59 $\pm$ 3.85	1.03 $\pm$ 1.63	1.83 $\pm$ 2.78	0.67 $\pm$ 1.03	2.21 $\pm$ 3.21	1.09 $\pm$ 1.71	1.01 $\pm$ 1.62
	5h	0.88 $\pm$ 1.20	0.46 $\pm$ 0.70	0.50 $\pm$ 0.59	0.23 $\pm$ 0.32	0.67 $\pm$ 0.72	0.50 $\pm$ 0.75	0.47 $\pm$ 0.73
	10h	0.20 $\pm$ 0.12	0.23 $\pm$ 0.32	0.14 $\pm$ 0.11	0.04 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.17	0.22 $\pm$ 0.29	0.15 $\pm$ 0.20
	24h	0.08 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.36	0.04 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.10	0.06 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.19	0.03 $\pm$ 0.02
Iso-Butyric	0h	1.72 $\pm$ 2.56	0.48 $\pm$ 0.78	0.75 $\pm$ 1.09	0.23 $\pm$ 0.35	0.26 $\pm$ 0.32	0.57 $\pm$ 0.94	0.42 $\pm$ 0.69
	5h	0.37 $\pm$ 0.37	0.14 $\pm$ 0.19	0.21 $\pm$ 0.15	0.06 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.22	0.15 $\pm$ 0.21	0.12 $\pm$ 0.17
	10h	0.09 $\pm$ 0.02*	0.08 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.04
	24h	0.07 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.15	0.07 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.04	0.04 $\pm$ 0.03
Iso-Valeric	0h	2.06 $\pm$ 3.07	0.61 $\pm$ 0.95	1.02 $\pm$ 1.46	0.31 $\pm$ 0.43	2.34 $\pm$ 3.41	0.71 $\pm$ 1.10	0.54 $\pm$ 0.83
	5h	0.44 $\pm$ 0.54	0.21 $\pm$ 0.25	0.23 $\pm$ 0.19	0.10 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.27	0.25 $\pm$ 0.30	0.19 $\pm$ 0.24
	10h	0.09 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.14	0.08 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.09	0.09 $\pm$ 0.06
	24h	0.12 $\pm$ 0.12	0.33 $\pm$ 0.41	0.11 $\pm$ 0.14	0.10 $\pm$ 0.10	0.05 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.11	0.10 $\pm$ 0.09

\* $p$ <0.05; significantly different from Lb GG + cellulose at the same time point.



## 5. CONCLUSIONS





1. Higher levels of lactobacilli can result from the presence of *Lactobacillus plantarum* C4 and fructooligosaccharides. Thus, this synbiotic may have superior effects, compared to fructooligosaccharides alone, to modulate the faecal microbiota, increasing some health-promoting bacteria in the large intestine.
2. The strain *Lactobacillus plantarum* C4 showed more hydrophilic character and better adhesion to epithelial cells, in comparison with *Lactobacillus rhamnosus* GG.
3. Although *in vivo* studies should confirm these effects, the results are promising due to the oligosaccharides content in goat's milk compared to cow's milk.

### **Conclusiones**

1. El estudio de la composición de la microbiota fecal muestra mayores niveles de lactobacilos en presencia de *Lactobacillus plantarum* C4 y fructooligosacáridos. Por tanto, este simbiótico podría modular la microbiota en el intestino grueso, en comparación con fructooligosacáridos solos.
2. La cepa *Lactobacillus plantarum* C4 mostró un carácter más hidrofílico y una mejor adhesión a células epiteliales, en comparación con *Lactobacillus rhamnosus* GG.
3. Aunque estos efectos deben ser confirmados con estudios *in vivo*, son resultados prometedores dado el contenido natural de oligosacáridos en la leche de cabra respecto a la leche de vaca.



## 6. REFERENCES





**A**

Abraham SN, Sharon N, Ofek I. *Adhesion of bacteria to mucosal surfaces*. In: Ogra PL, Lamm ME, Brenenstock J, McGhee JR. (Ed.). *Mucosal Immunity*. Academic Press. New York, 1999.

Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, von Wright A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65:351-4.

**B**

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005, 307:1915-20.

Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, Saarela M, Saxelin M, Collins K, Morelli L. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci Technol* 1999, 10:405-10.

Bujalance C, Moreno E, Jiménez-Valera M, Ruiz-Bravo A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int J Food Microbiol* 2007, 113:28-34.

**C**

Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. *In vitro* evaluation of single- and multi-strain probiotics: inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe* 2012, 18(4):405-13.

Collado MC, Surono I, Meriluoto J, Salminen S. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *J Food Sci* 2007, 72(3):89-93.

**D**

Daims H, Bröls A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 1999, 22(3):434-44.

Deepika G, Green RJ, Frazier RA, Charalampopoulos D. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J Appl Microbiol* 2009, 107:1230-40.

Deepika G, Rastall RA, Charalampopoulos D. Effect of food models and low-temperature storage on the adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG to Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2011, 59:8661-6.

Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol* 2000, 31:438-42.

Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J Food Sci* 2007, 72:M310-5.

## **E**

Ehrmann MA, Kurzak P, Bauer J, Vogel RF. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol* 2002, 92:966-75.

## **F**

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. <ftp://ftp.fao.org/esn/esn/food/wgreport2.pdf>

Fernandes J, Vogt J, Wolever TMS. Inulin increases short-term markers for colonic fermentation similarly in healthy and hyperinsulinaemic humans. *Eur J Clin Nutr* 2011, 65:1279-86.

Fooks LJ, Gibson GR. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe* 2003, 9:231-42.

Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhan T, Chen H, Zhu W, Sartor RB, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR, Li E. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011, 17:179-84.

Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64:3336-45.

## **G**

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota—introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995, 125:1401-12.

Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 2001, 67:207-16.

Gueimonde M, Jalonen L, He F, Hiramatsu M, Salminen S. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Res Int* 2006, 39 467-71.

**H**

Harmsen HJM, Gibson GR, Elfferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo AC, Argaiz A, Roberfroid MB, Welling GW. Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1999, 183:125-9.

Hickson M. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection. *Therap Adv Gastroenterol* 2011, 4:185-97.

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002, 22:283-307.

**K**

Kaplan H, Hutkins RW. Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69:2217-22.

Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* 2003, 94:981-7.

**L**

Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MHF, Welling GW. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. With genus-specific 16S ribosomal-RNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995, 61:3069-75.

Lee YK, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Tuomola EM, Salminen S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66:3692-7.

**M**

Macfarlane GT, Gibson GR. Carbohydrate fermentation, energy transduction, and gas metabolism in the human large intestine. In: Mackie RI, White BA. (Eds.). *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman and Hall. London, 1997.

Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006, 55:205-11.

Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum

cytophaga–flavobacter–bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 1996, 142:1097-106.

Martín-Peláez S, Gibson GR, Martín-Orue SM, Klinder A, Rastall RA, La Ragione RM, Woodward MJ, Costabile A. *In vitro* fermentation of carbohydrates by porcine faecal inocula and their influence on *Salmonella* Typhimurium growth in batch culture systems. *FEMS Microbiol Ecol* 2008, 66:608-19.

Masco L, Huys G, De Brandt E, Temmerman R, Swings J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 2005, 102:221-30.

## O

Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Gronlund MM, Isolauri E, Salminen SJ. Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *Int Dairy J* 1999, 9:623-30.

## R

Ramette A. Multivariate analysis in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 2007, 62:142-60.

Rammani P, Chitarrari R, Tuohy K, Grant J, Hotchkiss S, Philp K, Campbell R, Gill C, Rowland I. *In vitro* fermentation and probiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe* 2012, 18:1-6.

Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Li X, Tian M, Du S, Guo H, Liu C, Zhu N, Sun D, Li Y, Jin N. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe* 2012, 18(5):508-15.

## S

Salazar N, Gueimonde M, Hernández-Barranco AM, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG. Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:4737-45.

Salazar N, Ruas-Madiedo P, Kolida S, Collins M, Rastall R, Gibson G, de los Reyes-Gavilán CG. Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *Int J Food Microbiol* 2009, 135:260-7.

Salyers AA. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1984, 38:293-313.

Saulnier DMA, Gibson GR, Kolida S. *In vitro* effects of selected synbiotics on the human faecal microbiota composition. *FEMS Microbiol Ecol* 2008, 66:516-27.

**T**

Tilg H. Obesity, metabolic syndrome, and microbiota multiple interactions. *J Clin Gastroenterol* 2010, 44:S16-8.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006, 444:1027-31.

**V**

Vaughan EE, Mollet B. Probiotics in the new millennium. *Nahrung* 1999, 43(3):S148-53.

Vinderola CG, Medici M, Perdígón G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J Appl Microbiol* 2004, 96:230-43.

Vogt JA, Pencharz PB, Wolever TMS. L-Rhamnose increases serum propionate in humans. *Am J Clin Nutr* 2004, 80(1):89-94.

**Z**

Zárate G, De Ambrosini VIM, Chaia AP, González SN. Adhesion of dairy propionibacteria to intestinal epithelial tissue *in vitro* and *in vivo*. *J Food Protect* 2002, 65:534-9.



# RESUMEN Y CONCLUSIONES





La leche de cabra tiene un alto valor nutricional y sus beneficios saludables están bien demostrados, siendo una materia prima muy apreciada en la fabricación de quesos pero no de otros fermentados lácteos. Algunos países europeos como Francia, España y Grecia están a la cabeza de la producción mundial de leche de cabra. Este ganado ha sido un pilar económico en el desarrollo de zonas geográficas desfavorecidas en Andalucía; la utilización de la leche de cabra contribuye al mantenimiento de la población, conjugando tradiciones con los nuevos avances científicos y tecnológicos.

El consumo de leche y derivados se debe considerar en el contexto de una alimentación variada y equilibrada. Se ha observado que la ingesta elevada de productos lácteos y en particular de yogur, se acompaña de una mayor calidad de vida. Teniendo en cuenta que las leches fermentadas presentan algunas ventajas sobre otros lácteos, se recomienda incluirlas en la dieta y diversificar el consumo diario de estos productos.

El interés y beneficios saludables de las leches fermentadas han convertido este sector en uno de los más dinámicos de la industria láctea. El desarrollo de leches fermentadas de cabra con probióticos ha sido recomendado en el campo de la producción de fermentados lácteos, en base a los beneficios que estos microorganismos confieren al huésped.

En este contexto, la Junta de Andalucía concedió el proyecto de investigación de excelencia AGR-4915 titulado “La leche de cabra como base para la elaboración de un fermentado lácteo. Propuesta de un alimento funcional”. La hipótesis de partida es el desarrollo de un fermentado desnatado de leche de cabra con efecto probiótico, que permitirá proporcionar un alimento con interés nutricional para ser consumido por la población en general y en especial por grupos de población en riesgo nutricional, como los niños y las personas mayores, y al mismo tiempo colaborar al desarrollo sostenible de este sector lácteo.

La presente Memoria de Tesis Doctoral, asociada a dicho proyecto, consta de cuatro capítulos que incluyen el diseño y desarrollo del producto, el estudio de la biodisponibilidad de minerales, la investigación de los efectos protector y regenerador sobre la barrera de permeabilidad intestinal y la evaluación de la modulación de la microbiota intestinal.

En el primer capítulo se optimizaron las condiciones de elaboración de una leche de cabra fermentada desnatada, utilizando la ultrafiltración como método de

concentración de la leche de partida, y añadiendo *Lactobacillus plantarum* C4, una cepa potencialmente probiótica con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, al cultivo propio del yogur (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). El proceso de elaboración requirió una temperatura de incubación de 37°C y alcanzar un pH final de 4,2. Una vez obtenido el producto, se llevó a cabo su caracterización microbiológica, físico-química y de propiedades de textura. No se observaron interacciones negativas entre los microorganismos propios del yogur y la cepa *L. plantarum* C4 se mantuvo a concentraciones óptimas para ejercer su efecto probiótico ( $10^9$  ufc/mL) tras cuatro semanas desde la elaboración del producto. Desde el punto de vista nutricional, el producto presentó un bajo contenido energético y alto contenido en proteínas, respecto a las leches de cabra fermentadas comerciales, debido a la ultrafiltración de la leche de partida, que además mejoró la sinéresis y viscosidad del producto final. El valor nutricional se presenta a continuación.

Información nutricional. Valores medios por 100 g	
Valor energético (kcal)	37
Valor energético (kJ)	156
Proteínas (g)	5,8
Lactosa (g)	3,3
Grasa (g)	0,1
Calcio (mg)	164

Se ha postulado que la biodisponibilidad de ciertos minerales es superior en leche de cabra que en leche de vaca, siendo escasos los datos relativos a leches de cabra fermentadas. Además, ciertos microorganismos probióticos podrían aumentar la biodisponibilidad de minerales. Por ello, en el segundo capítulo se determinó el contenido de Ca, Mg, P y Zn en el producto, así como su biodisponibilidad, mediante métodos *in vitro* de solubilidad y dializabilidad y ensayos con la línea celular Caco-2. Se observó un mayor contenido mineral en la leche fermentada experimental que en leches de cabra fermentadas comerciales, ya que la ultrafiltración concentra la fracción de estos minerales unida a caseínas. La concentración de Ca en el producto supone un 20,5% de los valores de referencia de nutrientes. La biodisponibilidad mineral también fue superior en la leche fermentada experimental, posiblemente debido al pH final del producto y al mayor contenido en caseína, que facilita la generación de péptidos bioactivos. Este último aspecto es objeto de estudio de otra Tesis Doctoral integrada en el proyecto.

Por otra parte, algunos probióticos han sido exitosamente usados en la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, destacando entre sus mecanismos de acción, la mejora en la función de la barrera intestinal. El tercer capítulo se centra en la investigación de los posibles efectos protector y regenerador de *L. plantarum* C4 sobre la permeabilidad de dicha barrera. Se observó que efectivamente la cepa podría ejercer dichos efectos y prevenir con ello disfunciones en la barrera intestinal, pues mitigó parcialmente los daños inducidos por TNF- $\alpha$  y bilirrubina.

Existe también considerable interés en la eficacia de los probióticos para restaurar una microbiota alterada o preservar un equilibrio microbiano, que podría proteger frente a la invasión de patógenos y mejorar la salud intestinal. La hidrofobicidad y la habilidad de los probióticos para adherirse a la mucosa influyen en su interacción con el hospedador y los microorganismos presentes en el intestino. En base a ello, y para considerar no sólo la barrera epitelial sino también el lumen intestinal, en el cuarto estudio se evaluaron el carácter hidrofóbico y la habilidad de adhesión *in vitro* a células Caco-2 de *L. plantarum* C4 y *Lactobacillus rhamnosus* GG, un microorganismo probiótico ampliamente usado en leches fermentadas, así como sus propiedades de fermentación, determinando los cambios producidos en la composición de la microbiota fecal y en los niveles de ácidos grasos de cadena corta. La cepa *L. plantarum* C4 mostró un carácter más hidrofílico y una mejor adhesión a células epiteliales que *L. rhamnosus* GG. Además, la presencia de *L. plantarum* C4 y fructooligosacáridos puede modular la microbiota fecal, incrementando bacterias que promueven la salud en el intestino grueso, como son los lactobacilos.

De todo lo expuesto, se puede concluir que el método de elaboración optimizado mediante desnatado, ultrafiltración de la leche e incorporación de *L. plantarum* C4, proporciona un producto estandarizado, con buenas cualidades reológicas, con un bajo contenido energético y, en comparación con los productos comerciales existentes, con alto contenido en proteína y calcio biodisponible. Los modelos experimentales utilizados para evaluar los efectos de *L. plantarum* C4 muestran que este microorganismo tiene potencial para prevenir o atenuar disfunciones en la barrera intestinal y, en simbiosis con fructooligosacáridos, modular la microbiota intestinal.

Actualmente, se están investigando los beneficios del producto en animales de experimentación.



# SUMMARY AND CONSLUSIONS





Goat's milk has many health benefits and high nutritional value. It is valued for the manufacture of cheese but not for other fermented products. Some European countries such as France, Spain and Greece are at the forefront of the world production of goat's milk. Dairy goat farming plays a vital role in the development of disadvantaged geographical areas in Andalusia; the use of goat's milk contributes to the maintenance of the population, combining traditional methods with new scientific and technological advances.

The consumption of milk and dairy products should be considered in a varied and balanced diet. It has been observed that a high intake of dairy products, especially yoghurt, leads to a better quality of life. Taking into account that fermented milks present some benefits compared to other dairy products, it is recommended to include them in the diet and diversify the consumption of these products.

The interest and health benefits of fermented milks have made this sector one of the most dynamic in the dairy industry. The development of fermented goat's milks with probiotics has been recommended in the production of fermented products, due to the benefits that these microorganisms confer to the consumer host.

In this context, the Government of Andalusia awarded the excellence research project AGR-4915 entitled "Goat's milk as a basis for the manufacture of a fermented milk. Proposal for a functional food". The aim is to develop a fermented goat's skimmed milk with probiotic effect, providing a food with a nutritional value which will be consumed by the general population and especially by groups at nutritional risk, such as children and the elderly, while collaborating on sustainable development in this dairy sector.

The present Doctoral Thesis, associated to the project, has four chapters which include the design and development of the product, study of mineral bioavailability, investigation of protective and regenerative effects on the intestinal permeability barrier and finally, evaluation of the modulation of the intestinal microbiota.

In the first chapter, the conditions for the elaboration of a fermented goat's skimmed milk were optimized, using ultrafiltration as a concentration method of the milk, and adding *Lactobacillus plantarum* C4, a strain potentially acting as a probiotic with antimicrobial and immunomodulatory properties, to the starter microorganisms of the yoghurt (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). The manufacture required an incubation temperature of 37°C and a final pH of 4.2. Microbiological, physico-chemical and textural characterization was carried out. The microorganisms

of the yoghurt and *Lactobacillus plantarum* C4 showed no negative interactions during the fermentation process, and this strain exhibited optimal concentrations to exert its probiotic effects ( $10^9$  cfu/mL) four weeks after the elaboration of the product. From a nutritional point of view, the product has low energy content and high protein content, compared to commercial fermented goat's milks, due to the ultrafiltration of the milk, which also improved the syneresis and viscosity of the final product. The nutritional value is presented below.

Nutritional information. Mean values per 100 g	
Energy value (kcal)	37
Energy value (kJ)	156
Proteins (g)	5.8
Lactose (g)	3.3
Fat (g)	0.1
Calcium (mg)	164

It has been reported that the bioavailability of certain minerals is higher in goat's milk, in comparison to cow's milk, although data about fermented goat's milk are scarce. In addition, some probiotic microorganisms could increase mineral bioavailability. Therefore, in the second chapter Ca, Mg, P and Zn levels in the product were determined, as well as their bioavailability using *in vitro* methods of solubility, dializability and assays with Caco-2 cell culture. Higher mineral content was observed in the experimental fermented milk than in the commercial ones, as the ultrafiltration concentrates these minerals fraction associated with caseins. Ca concentration in the product is a 20.5% of the nutrient reference values. Mineral bioavailability was also higher in the experimental fermented milk, probably due to the final pH of the product and higher casein content, which favours the generation of bioactive peptides. This latter aspect is studied in another Doctoral Thesis associated to the project.

Some probiotics have been successfully used in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases, one of their action mechanisms is the improvement of the intestinal barrier function. The third chapter investigated protective and regenerative effects of *L. plantarum* C4 on the permeability of the barrier. The strain was observed to exert those effects and thereby prevent intestinal barrier dysfunction, as it partially mitigated the TNF- $\alpha$ - and bilirubin-induced damage.

Restoration of the altered microbiota or preservation of a healthy microbial balance with probiotics could protect against pathogen invasion and/or colonisation, as well as improve gut health and wellbeing. Hydrophobicity and ability to adhere to the intestinal

mucosa influences their interaction with the host and the microbiota. To address the intestinal lumen and epithelial barrier, in the fourth chapter we investigated hydrophobic character and ability to adhere *in vitro* to Caco-2 cells of *L. plantarum* C4 and *Lactobacillus rhamnosus* GG, a species widely used as adjunct culture in functional dairy products. Concomitantly, fermentation properties were also evaluated, determining changes in the composition of faecal bacteria and levels of short chain fatty acids. *L. plantarum* C4 showed more hydrophilic character and better adhesion to epithelial cells, in comparison with *L. rhamnosus* GG. Besides, the presence of *L. plantarum* C4 and fructooligosaccharides can modulate faecal microbiota, increasing health-promoting bacteria in the large intestine, such as lactobacilli.

From these results, it can be concluded that the elaboration method optimized using skimmed, milk ultrafiltration and incorporation of *L. plantarum* C4, provides a standardized product with good rheological properties, with low energy content and, in comparison to existing commercial products, it has high content in protein and bioavailable calcium. Experimental models used to assess *L. plantarum* C4 effects show that this microorganism has the potential to prevent or attenuate intestinal barrier dysfunction and, in symbiosis with fructooligosaccharides, modulate the intestinal microbiota.

Currently, the benefits of the product are being assessed in experimental animals.



# Índice de figuras

## Capítulo I

1. Evolución del consumo anual de productos lácteos en los hogares españoles .....	18
2. Evolución del consumo anual de los distintos tipos de derivados lácteos en los hogares españoles.....	18
3. Propiedades beneficiosas atribuidas a leches fermentadas con probióticos.....	20
4. Producción media de leche de cabra en el mundo .....	23
5. Producción de leche de distintas especies animales en España .....	24
6. Producción de leche de cabra en España. Período 1990-2010 .....	25
7. Producción de leche de cabra en distintas comunidades españolas .....	25
8. Esquema de la elaboración de la leche de cabra fermentada desnatada, con efecto probiótico.....	45
9. Combinaciones estudiadas en los ensayos de antibiosis .....	48
10. Esquema del método de Kjeldahl para la determinación de proteínas en leche y leche fermentada .....	52
11. Optimización del proceso de elaboración de la leche de cabra fermentada desnatada, con efecto probiótico.....	62
12. A) Comparación del crecimiento del starter solo en la leche fermentada control, y junto con <i>L. plantarum</i> C4 en la leche fermentada experimental. B) Comparación del crecimiento de <i>L. plantarum</i> C4 solo en la leche, y junto con el starter en la leche fermentada experimental. C) Representación del crecimiento de las cepas durante el proceso de fermentación .....	64
13. Comportamiento reológico de las distintas leches fermentadas. ....	76

**Capítulo II**

14. Posibles aplicaciones de la evaluación de la biodisponibilidad de minerales en alimentos o dietas.....	104
15. Factores que influyen en la biodisponibilidad de minerales .....	106
16. Estructura del intestino humano y del enterocito maduro .....	116
17. Etapa gástrica en el ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> para estimar la fracción soluble.....	131
18. Etapa intestinal en el ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> para estimar la fracción soluble.....	132
19. Etapa gástrica en el ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> para estimar la fracción dializable .....	135
20. Determinación del título de acidez en el ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> para estimar la fracción dializable.....	136
21. Etapa intestinal en el ensayo de biodisponibilidad <i>in vitro</i> para estimar la fracción dializable .....	137
22. Esquema de un cuadrante en la cámara de Neubauer.....	139
23. a) Frasco Shell-vial. b) Morfología de la línea celular Caco-2.....	140
24. Esquema de una placa bicameral.....	144
25. Ensayos de transporte y captación de minerales con la línea celular Caco-2.....	146
26. Mineralización de las muestras .....	147
27. Aumento de la TEER en función del tiempo .....	162
28. Transporte de rojo fenol en función del tiempo.....	162
29. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de calcio en las leches fermentadas .....	165
30. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de magnesio en las leches fermentadas.....	171
31. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de fósforo en las leches fermentadas .....	173
32. Biodisponibilidad <i>in vitro</i> de zinc en las leches fermentadas.....	177

**Capítulo III**

33. Estructura de una vellosidad intestinal y complejo de unión entre células epiteliales .....	207
34. Aumento de la TEER en función del tiempo. ....	239
35. Transporte de rojo fenol en función del tiempo. ....	239
36. Pérdida de TEER de la monocapa celular tras los ensayos de protección y regeneración .....	241
37. Aumento/pérdida de paso de colorante de la monocapa celular tras los ensayos de protección y regeneración .....	242

**Capítulo IV**

38. A batch culture vessel showing important components and ports necessary to run single stage batch culture fermentations .....	288
39. Batch culture vessels set up running in parallel .....	288
40. Growth curves of <i>L. plantarum</i> C4 and <i>L. rhamnosus</i> GG expressed as log cfu/mL and optical density at 600nm (OD <sub>600</sub> ) .....	295
41. Adhesion of <i>L. plantarum</i> C4 and <i>L. rhamnosus</i> GG cells to Caco-2 cells, expressed as the number of adhered bacterial cells per Caco-2 cell .....	296
42. A) Hydrophobicity of <i>L. plantarum</i> C4 and <i>L. rhamnosus</i> GG cells expressed as percentage of bacteria adsorbed by hexadecane as measured by the MATH assay. B) Adhesion to hexadecane of <i>L. plantarum</i> C4 and <i>L. rhamnosus</i> GG in the syringe, respectively .....	298
43. Bacterial populations analysed by fluoresce in situ hybridisation in batch cultures containing different probiotics. Bif164: <i>Bifidobacterium</i> spp. Lab158: <i>Lactobacillus/Enterococcus</i> spp .....	301
44. Bacterial populations analysed by fluoresce in situ hybridisation in batch cultures containing different probiotics. Bac303: <i>Bacteroides-Prevotella</i> group. Chis150: <i>C. histolyticum</i> group clusters I, II .....	302

45. Bacterial populations analysed by fluoresce in situ hybridisation in batch cultures containing different probiotics. Erec482: *Clostridium* clusters XIVa+b. Eub338 I-II-III: Most bacteria ..... 303

# Índice de tablas

## **Capítulo I**

1. Composición media de leche de cabra, oveja, vaca y humana .....	26
2. Composición de la leche de cabra de diferentes razas y países .....	26
3. Composición del medio LPSM ( <i>L. plantarum</i> selective medium) .....	46
4. Ejemplos de leches fermentadas con probióticos comerciales .....	59
5. Crecimiento de los microorganismos fermentadores a 37°C y 42°C.....	61
6. Resultados del co-cultivo (inóculo <i>L. plantarum</i> C4 a $10^5$ - $10^6$ ufc/mL).....	65
7. Resultados del co-cultivo (inóculo <i>L. plantarum</i> C4 a $10^8$ - $10^9$ ufc/mL).....	66
8. Inhibiciones entre cepas en ensayos de antibiosis mediante el “spot test”. Diámetros de inhibición (mm).....	66
9. Recuentos bacterianos (log ufc/mL) tras la fermentación y transcurridas 3, 4, 5 y 6 semanas de almacenamiento a 4°C de las leches fermentadas control y experimental.....	69
10. Resultados de los análisis físico-químicos de la leche .....	70
11. Resultados de los análisis físico-químicos de las leches fermentadas .....	70
12. Composición físico-química de leches y leches fermentadas de cabra .....	71
13. Porcentaje de sinéresis en las distintas leches fermentadas .....	74

## **Capítulo II**

14. Longitudes de onda de cada elemento en ICP-AES.....	148
15. Preparación de la curva de calibración del P.....	149
16. Valores determinados y certificados para el patrón externo .....	150
17. Concentraciones de Ca, Mg, P y Zn en la leche de partida y en las leches fermentadas .....	155

18. Concentración total de Ca, Mg, P y Zn en leches fermentadas. Datos obtenidos por otros autores .....	156
19. Viabilidad y actividad metabólica de las células Caco-2 en contacto con los sobrenadantes procedentes de la digestión <i>in vitro</i> .....	161
20. Concentración de calcio en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión <i>in vitro</i> de las leches fermentadas .....	164
21. Retención, transporte y captación de calcio en las leches fermentadas tras los ensayos con células Caco-2 .....	164
22. Biodisponibilidad de calcio en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores .....	165
23. Concentración de magnesio en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión <i>in vitro</i> de las leches fermentadas .....	170
24. Retención, transporte y captación de magnesio en las leches fermentadas tras los ensayos con células Caco-2 .....	170
25. Biodisponibilidad de magnesio en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores .....	171
26. Concentración de fósforo en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión <i>in vitro</i> de las leches fermentadas .....	173
27. Biodisponibilidad de fósforo en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores .....	174
28. Concentración de zinc en las fracciones solubles y dializadas tras la digestión <i>in vitro</i> de las leches fermentadas .....	176
29. Retención, transporte y captación de zinc en las leches fermentadas tras los ensayos con células Caco-2 .....	176
30. Biodisponibilidad de zinc en leche y derivados lácteos. Datos obtenidos por otros autores .....	177

**Capítulo III**

31. Concentraciones y tiempos ensayados mediante el método de tinción con rojo neutro y MTT ..... 230
32. Esquema de los ensayos para evaluar los efectos protector y regenerador de *L. plantarum* C4 frente a un daño causado por TNF- $\alpha$  ..... 233
33. Esquema de los ensayos para evaluar los efectos protector y regenerador de *L. plantarum* C4 frente a un daño causado por UCB ..... 233
34. Viabilidad y actividad metabólica de las células Caco-2 tras ensayar la suspensión de *L. plantarum* C4, el TNF- $\alpha$  y la UCB ..... 238

**Capítulo IV**

35. FISH oligonucleotide probes used in this study ..... 290
36. SCFA concentrations in pH-controlled batch cultures at 0, 5, 10 and 24 h ..... 307