

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS
EN POLÍMEROS MICROBIANOS: EVALUACIÓN DE LA
CAPACIDAD PROTECTORA DE LA ENCAPSULACIÓN
PARA SU ADMINISTRACIÓN ORAL**

Memoria presentada por la Licenciada María Luján Jiménez Pranteda para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Luján Jiménez Pranteda
D.L.: GR 791-2011
ISBN: 978-84-694-0178-1

Memoria presentada por la Licenciada María Luján Jiménez Pranteda para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 2010

Vº Bº LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

Dr. Alberto Ramos Cormenzana
Catedrático Emérito del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Dra. Mercedes Monteoliva Sánchez
Catedrática del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Dra. Margarita Aguilera Gómez
Incorporado Doctor del Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

La presente tesis Doctoral se llevó a cabo gracias al disfrute de una beca del plan de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (FPU) y se desarrolló dentro del marco del proyecto de investigación “Evaluación de la supervivencia y actividad biológica de microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos” (Plan Nacional I+D, MCYT AGL2005-06108/ALI).

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido presentados en congresos nacionales e internacionales o están pendientes de publicación:

PUBLICACIONES

Jiménez-Pranteda, M.L., Poncelet, D., Náder-Macías, M.E., Arcos, A., Aguilera, M.; Ramos-Cormenzana, A. and Monteoliva-Sánchez, M. (2010). Encapsulation of probiotic bacteria in microbial polymers by electrostatic droplet generation and their survival in simulated gastrointestinal conditions. MS in preparation.

Monteoliva-Sánchez, M., Aguilera, M., **Jiménez-Pranteda, M.L.**, Ramos-Cormenzana, A. (En prensa) Probióticos en las distintas etapas de la vida. En: Probióticos y Salud. Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M. y Náder-Macías, M.E. Ed. Díaz de Santos, Madrid (España)

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Internacionales

Jiménez-Pranteda M.L., Poncelet D., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2009) Viability of probiotics exopolymers beads exposed to specific in vitro condition. In XVII International Conference on Bioencapsulation, 2009, Groningen, Netherlands, September 24th-26th.

Jiménez-Pranteda M.L., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Poncelet D. (2008) Encapsulation Of Probiotics With The Dripping Mode By Using An Electrostatic Potential Application. In Food Micro 2008, Aberdeen Scotland, September 1st-4th.

Nacionales

Jiménez-Pranteda M.L., Monteoliva-Sanchez M., Ramos-Cormenzana A. (2007) Estudio de la capacidad de biopolímeros microbianos para encapsular microorganismos probióticos del género *Lactobacillus*. Evaluación de la viabilidad. En XXI Congreso nacional de Microbiología, Sevilla, 17-20 Septiembre.

OTRAS PUBLICACIONES DE LA DOCTORANDA

Kharroub K., Aguilera M., **Jimenez-Pranteda M. L.**, González-Paredes A, Ramos-Cormenzana A. and Monteoliva-Sánchez M (2010). *Marinobacter oulmensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from brines of Ain Oulmene in Algeria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. MS with minor revisions.

Aguilera M., **Jimenez-Pranteda M. L.**, Kharroub K., González-Paredes A, Durban J.J., Russell N.J., Ramos-Cormenzana A. and Monteoliva-Sánchez M. (2009) *Marinobacter lacisalsi* sp. nov. a moderately halophilic bacterium isolated from the saline-wetland wildfowl reserve "Fuente de Piedra" in Southern Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59; 1691-1695.

Karrhoub K., **Jimenez-Pranteda M.L.**, Aguilera M., Boulahrouf A., Ramos-Cormenzana A. and Monteoliva-Sánchez M. (2008) *Halomonas sabkhae* sp. nov., a moderately halophilic bacteria isolated from an Algerian sabkha. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50; 40-44

Congresos Nacionales

Aguilera M., Jiménez-Valverde A., **Jiménez-Pranteda M.L.** Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. (2010) "Molecular approaches for comparing archaeal and bacterial diversity of several Andalusian salt lakes: Fuente de Piedra, La Malahá, Bahía de Cádiz". In XIII Meeting on Microbial Taxonomy, Phylogeny and Diversity, Sevilla, May 13th-15th. **Comunicación Oral.**

Ferrer-Cebrián R., **Jiménez-Pranteda M.L.**, Vieites J.M, Monteoliva-Sánchez M., Maldonado J., Gil A., Ramos-Cormenzana A. (2006) *Influencia de la alimentación con "leche de continuación" suplementada con probióticos en la evolución de la microbiota*

intestinal de niños de 6 a 12 meses. In XI Reunión del Grupo de Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad Bacteriana de la Sociedad Española de Microbiología, Rincón de la Victoria (Málaga), 14-16 Junio 2006. **Comunicación Oral**.

Congresos Internacionales

Nader-Macias M.E., Abdelaziz E., **Jimenez-Pranteda M.L.**, Monteoliva-Sanchez M. and Ramos-Cormenzana A. (2009) *Efficiency of encapsulation of beneficial lactic acid bacteria with the dripping method, and survival at different storage temperatures*. In III Simposio Internacional de Bacterias Lácticas, segundo Encuentro Red BAL Argentina, San Miguel de Tucumán (Tucumán, Argentina), 15-17 de Septiembre de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Cinco años han pasado ya desde que esta aventura del doctorado comenzó. Cinco años que han pasado en un suspiro y en los cuales hubo momentos en los que parecía que el tiempo se había parado y se había aliado contra mí y otros en los que hubiera deseado que el tiempo se detuviera para saborearlos mejor. Durante este tiempo he podido crecer científicamente, pero también personalmente, y esto último solo ha sido posible gracias a las personas que se han ido cruzando en mi camino. Es a ellas, que no aparecen en los créditos científicos, a quienes quiero demostrar mi agradecimiento en esta pequeña pero no menos importante parte de mi tesis.

En primer lugar a mis directores de tesis, el Dr. Alberto Ramos Cormenzana y la Dra. Mercedes Monteoliva Sánchez, la oportunidad que me brindaron en su día abriéndome las puertas de su laboratorio, la confianza que depositaron en mi capacidad para sacar este trabajo adelante y su paciencia. Y, por supuesto, a mi otra directora de tesis, Margarita Aguilera Gómez, porque más que una directora ha sido una compañera de fatigas. Gracias Marga por decirme las palabras justas cuando más lo necesitaba, sin ti este último año no habría sido lo mismo.

A la Dra. Fátima Náder Macías, por su incalculable ayuda en el campo de los microorganismos probióticos, por saber entenderme y tenderme su mano sin pedírsela.

Al Dr. Denis Poncelet, por descubrirme el mundo de la encapsulación en su laboratorio en Nantes (Francia) y tratarme como un miembro más de su grupo, y a mis compañeros del GEPEA, a los que siguen allí y a los que se han ido, pero sobre todo, à tous ceux qui sont passés par l'étage bleu!!Merci beaucoup!!

A las doctoras Anne McCartney y Lesley Hoyles, por acogerme en su grupo y por su inestimable ayuda, estando ahí siempre para echarme una mano. Thanks Anne for everything, for your knowledge and for being always so kind with me. And Lesley, I can only say THANK YOU, you taught me

everything I know about FISH and helped me even though you were sooo busy.

A los doctores Alfonso Ruiz-Bravo López, Maria Manuela Jiménez Valera y Encarnación Moreno Calvo, porque sin ellos la parte inmunológica de mi tesis no se habría podido llevar a cabo y, sobre todo, por ayudarme con mis ratitas. Nunca veré las tapas de la cafetería con los mismos ojos!

Al Dr. Antonio Arcos Cebrián, por conseguir salir a flote de mi marea de datos y proporcionarme su inestimable ayuda en su análisis estadístico.

A mis compañeros de laboratorio, que me han “sufrido” a lo largo de estos años, con mis agobios y estreses. A los que ya no están: Raquel, Susana, Tere Quesada, Xavi, Jose Antonio..., pero sobre todo a los que están: a Ana G., con la que he compartido todo el camino, por todos esos buenos (y malos) momentos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio y por ser más que una compañera, una amiga; Ana J., por compartir esos momentos en el “despachito” después de luchar con la TTGE, tu ya lo sabes; y también a Azahara, nuestra última incorporación, por ayudarme con mis animalitos cuando no podía más y por ese positivismo que irradias.

Dar las gracias también a los compañeros del departamento con los cuales he compartido muchos momentos; Ía y Magda, con las que compartí buenos momentos en torno a una tapa; Lamiae, que siempre tuvo una sonrisa y un momento para charlar; Rocío, por nuestras conversaciones matutinas, y a Cinta y Belén, por esas comidas amenas en nuestra biblioteca-comedor.

Gracias también a los bioquímicos, tanto a los farmacéuticos como a los “campuseros”, porque siempre que han podido no han dudado en ayudar: Sergio, Miriam, Rafa, Loles. A Antonio por dejarme utilizar su transiluminador sin límites. Y mención especial a “las gemelas”, Natalia y Laura, que aunque estén lejos se las echa de menos.

No me quisiera olvidar de mis niñas del 3-18 (y del 3-39, no Kiz?): Sandra, Kiz, Enma, Magda, Gurjot.... porque sin vosotras mi estancia en Reading no habría sido igual. Esos cafés en la library se siguen echando de menos!!!

Fuera del mundo científico, quiero agradecer especialmente a mis amigos y familia, por aguantar mis charlas sobre la tesis e interesarse por

este mundo loco de la investigación. Gracias Chica por estar siempre ahí, a lo largo de los años. A mis primos, por esas reuniones-barbacoas que tanto bien han hecho para mi salud mental. A Irene, que siempre ha tenido fe en mí. Y a todos aquellos que me dejó en el tintero pero que de un modo u otro me han apoyado, gracias de corazón.

Por último, pero no menos importante, a mis padres, porque sin ellos no habría sido posible haber llegado hasta aquí, por su apoyo incondicional y sin límites. Y a Eloy, por ser mi compañero de fatigas y de la vida, por estar ahí siempre y arracarme una sonrisa cuando más lo he necesitado. Gracias.

RESUMEN

Los efectos beneficiosos sobre la salud humana asociados a los microorganismos probióticos han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante numerosos estudios desde la época de Metchnikoff hasta la actualidad. Dentro de estos efectos beneficiosos, destacan aquellos asociados con el tracto gastrointestinal, el sistema inmune (entre los que se incluyen los procesos alérgicos), el sistema cardiovascular o con el tracto urogenital. Actualmente, el empleo de bacterias del ácido láctico probióticas, principalmente de aquellas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se ha generalizado mediante su incorporación en productos lácteos como el yogur. Es esta aplicación la que hace que, tanto la seguridad de estos probióticos como su estabilidad a lo largo del proceso de producción, sean un punto de especial atención.

Es en la estabilidad de estos microorganismos donde juegan un papel importante técnicas como la microencapsulación, que ofrecen una protección física a las bacterias frente a condiciones desfavorables a las que se pueden enfrentar durante los procesos de producción, almacenamiento y durante su paso a través del tracto gastrointestinal al administrarse por vía oral. Dentro de la microencapsulación existen muy diversos métodos, dependiendo del material a encapsular, así como también se han documentado diversos materiales de encapsulación. Los exopolisacáridos microbianos encuentran entre sus funciones biológicas la de proteger a las células microbianas frente a efectos adversos, lo que unido a la capacidad de algunos de ellos de gelificar y a su amplio uso en industria alimentaria, los hace útiles como posibles vehículos para la microencapsulación microbiana.

El presente trabajo de tesis aborda un estudio sobre el potencial de empleo de polímeros microbianos como agentes para la microencapsulación de microorganismos probióticos, investigando la viabilidad de los probióticos encapsulados al exponerse frente a diversas condiciones desfavorables *in vitro* así como también la capacidad de colonización a nivel intestinal, el impacto sobre comunidades representativas de la microbiota fecal y su capacidad para modular la respuesta del sistema inmune en modelos murinos.

En los estudios iniciales se evaluó el potencial empleo de polímeros microbianos como matriz de encapsulación. Para ello, se llevó a cabo la microencapsulación de *Lactobacillus plantarum* CRL 1815, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 con diferentes combinaciones de polímeros microbianos: gelano, xantano, pululano y jamilano, este último obtenido a nivel de laboratorio a partir de *Paenibacillus jamilae*. Se emplearon técnicas de encapsulación basadas en el goteo de una suspensión microbiana en una mezcla de polímeros microbianos sobre una solución de recogida. Parámetros como el tamaño, forma y características mecánicas de las perlas obtenidas así como la viabilidad bacteriana tras los procesos de encapsulación fueron analizados. Los resultados determinaron que las mezclas idóneas para la encapsulación fueron Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) y el método de encapsulación elegido, el generador electrostático de goteo.

Los tres microorganismos así encapsulados fueron sometidos a test *in vitro* para evaluar el posible efecto protector de la encapsulación frente a diferentes condiciones: estabilidad/viabilidad durante el almacenamiento, diferentes pH y condiciones gastrointestinales simuladas. Para ello la viabilidad de las bacterias se determinó mediante técnicas microbiológicas clásicas de cultivo. También se evaluó en esta fase el efecto que las condiciones gastrointestinales simuladas pueden ejercer sobre propiedades probióticas como la auto-agregación y la producción de peróxido de hidrógeno.

Para determinar la capacidad de colonización a nivel intestinal, el impacto sobre comunidades representantes de la microbiota fecal y su capacidad para modular la respuesta del sistema inmune mediante modelos murinos se administró a ratas la cepa *L. plantarum* CRL 1815, previamente seleccionada atendiendo a los resultados de los tests *in vitro*, encapsulada en las 2 soluciones poliméricas diariamente durante 10 días. El impacto que la cepa probiótica, encapsulada y sin encapsular, puede ejercer sobre la microbiota fecal fue analizado mediante Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE), técnica, esta última, también empleada para estudiar la capacidad de colonización microbiana. La posible modulación de la respuesta inmune se abordó mediante estudios de linfoproliferación en respuesta a mitógenos.

En los estudios *in vitro*, los resultados obtenidos eran cepa-dependiente y fueron dispares en los diferentes estudios. La encapsulación no mejoró la viabilidad microbiana durante el almacenamiento ni tampoco se observó un efecto protector de la encapsulación a pH muy ácido en las condiciones de nuestro estudio. Sin embargo sí se observó una protección de las cápsulas frente a condiciones gastrointestinales simuladas, significativa cuando la matriz de encapsulación fue Xantano:Gelano (0,75%:1%). Las propiedades probióticas analizadas no se vieron afectadas, salvo puntualmente la producción de peróxido de hidrógeno en *L.rhamnosus* ATCC 53103.

En los estudios *in vivo*, según los resultados obtenidos por FISH, la administración de las perlas sin contenido bacteriano estimuló el crecimiento de los grupos microbianos estudiados. Las perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%) mostraron resultados positivos en cuanto a protección y detección de la bacteria probiótica y modularon los principales grupos microbianos (*C.coccoides-E.rectale* y Clostridial cluster IX). En los resultados obtenidos mediante TTGE no se observó un efecto claro de los distintos tratamientos sobre la composición de la microbiota intestinal, pero se consiguió aislar el microorganismo administrado asociado a un órgano cuando se administró encapsulado en Jamilano:Gelano (1%:1%). Finalmente, no se observó toxicidad ni inmunomodulación en los ensayos de linfoproliferación frente a mitógenos.

SUMMARY

The human health benefits associated to probiotics has been widely recognized and demonstrated since the Metchnikoff era until the present day. Within these beneficial effects, those ones associated with the gastrointestinal tract, immune system (included allergic process), cardiovascular system and urogenital tract could be emphasized as the main ones. Nowadays, the probiotic lactic acid bacteria, mainly those belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus, are widely used in the food industry, being incorporated to dairy products such as yogurt. This food application stresses the significance of the probiotic safety and stability along the processing.

Microencapsulation techniques may play an important role within the microorganisms' stability, offering them a physical barrier against adverse conditions such as those found during processing, storage and passage through the gastrointestinal tract, when they are orally delivered. Different techniques are available for microencapsulation, depending on the material to encapsulate. As a matrix for microencapsulation several materials, but mainly polysaccharides, has been employed. Microbial exopolysaccharides may function as a barrier to protect microbial cells against adverse effects. This fact, together with the ability of some of them to gelificate and their wide use in food industry, makes them an appropriate vehicle for microbial encapsulation.

This thesis deals with microbial polymers potential use as a matrix for probiotic microencapsulation. Probiotic viability, free and encapsulated, against several *in vitro* adverse conditions has been tested, as well its ability to colonize the intestinal mucosa, to interact with endogenous fecal microbiota and to modulate the immune response in murine models.

Initial studies evaluated the potential use of microbial polymers as a matrix for probiotic microencapsulation. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* CRL 1815, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 and *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 was carried out with different combinations of microbial polymers: gellan gum, xanthan gum, pullulan gum and jambilán, obtained from *Paenibacillus jambilae*. Dripping techniques are based on a forced dripping into a collecting solution of a probiotic suspension of

microbial polymers. Parameters such as size, shape and mechanical features were analyzed. Results established that Xanthan:Gellan gum (1%:0,75%) and Jamilan:Gellan gum (1%:1%) were the suitable polymer solutions for microencapsulation and the methodology finally chosen was the electrostatic bead generator.

Once established the encapsulation parameters, the three encapsulated microorganisms were tested *in vitro* to evaluate the encapsulation possible protective effect against several conditions: viability/stability during storage, a pH range and simulated gastrointestinal conditions. Bacteria viability was determined by classical culture microbiological techniques. It was also evaluated if the passage through simulated gastrointestinal conditions may affect probiotic properties such as auto-aggregation and hydrogen peroxide production.

To determine the ability to colonize the intestinal mucosa, the impact on the endogenous fecal microbiota and the modulation of the immune response, administration of free and encapsulated *L.plantarum* CRL 1815, previously selected for its *in vitro* results, was performed daily to rats during a 10 day period. The lactobacilli strain, free and encapsulated, impact on fecal microbiota was analyzed by using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) and Temporal Temperature-gradient Gel Electrophoresis (TTGE). TTGE was also employed to determine the ability of microbial colonization. The immunomodulation studies were carried out with mitogen-induced proliferation of spleen cells assays.

In vitro results were strain-dependent and uneven between studies. Microencapsulation did not improve bacterial viability during storage and very low pH, with our test conditions. However, some kind of protection was observed when exposed to simulated gastrointestinal conditions, significant when Xanthan:Gellan gum (1%:0,75%) was the encapsulation matrix. The probiotic properties analyzed were not affected, except for punctual variation on *L. rhamnosus* ATCC 53103 hydrogen peroxide production.

In vivo results obtained by FISH showed that bead without probiotic administration stimulated the growth of the colonic bacteria analyzed. Jamilan:Gellan gum (1%:1%) beads showed better results in terms of protection and availability of the probiotic bacteria and also presented modulating effects on the main bacterial groups (*C.coccoides-E.rectale* and Clostridial cluster IX).

TTGE results did not show a clear effect of the different treatments on microbial intestinal composition, but we were able to isolate the microorganism organ-associated when it was administered Jamilan:Gellan gum (1%:1%) encapsulated. Finally, neither toxicity nor immunomodulation were observed during the mitogen-induced proliferation of spleen cells assays.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Probióticos	3
1.1.1 Evolución del concepto “probiótico”	3
1.1.2 Selección de bacterias probióticas	6
1.1.3 Bacterias del Ácido Láctico o LAB	8
1.1.3.1 <i>Género Lactobacillus</i>	9
1.1.3.2 <i>Género Bifidobacterium</i>	14
1.1.4 Efectos beneficiosos de los probióticos	17
1.1.4.1 <i>Tracto gastrointestinal</i>	17
A-Intolerancia a la lactosa	18
B-Diarrea	19
C-Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)	19
D-Gastritis asociada a <i>Helicobacteri pylori</i>	20
E-Cáncer	21
1.1.4.2. <i>Sistema Inmune y Alergias</i>	21
1.1.4.3. <i>Sistema Cardiovascular: Hipercolesterolemia</i>	23
1.1.4.4. <i>Tracto Urogenital</i>	24
1.1.5 Probióticos en las distintas etapas de la vida	25
1.1.6 Seguridad y estabilidad de los microorganismos probióticos: requisitos para su aplicación alimentaria	28
1.2 Encapsulación de microorganismos probióticos	29
1.2.1 Métodos de encapsulación	31
1.2.1.1 <i>Metodología de emulsión</i>	31
1.2.1.2 <i>Metodología de extrusión o goteo</i>	33
1.2.1.3 <i>Spray-drying o Desecación por Atomización</i>	34
1.2.1.4 <i>Spray-cooling o Spray-chilling</i>	35
1.2.1.5 <i>Liofilización</i>	36
1.2.1.6 <i>Spray-coating o Pulverización</i>	36
1.2.1.7 <i>Adhesión a almidón</i>	37
1.2.1.8 <i>Recubrimiento de microcápsulas con otros polímeros</i>	38
1.2.2 Materiales de encapsulación	38
1.2.2.1 <i>Alginato</i>	39
1.2.2.2 <i>K-Carragenano</i>	39
1.2.2.3 <i>Chitosan o Quitosano</i>	40
1.2.2.4 <i>Almidón</i>	40
1.2.2.5 <i>Gelano</i>	41
1.2.2.6 <i>Xantano</i>	41

1.3 Polímeros microbianos	42
1.3.1 Clasificación de los exopolisacáridos microbianos	43
1.3.2 Composición, estructura y propiedades físicas de los exopolisacáridos	44
1.3.3 Funciones de los exopolisacáridos	45
1.3.4 Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos	46
1.3.4.1 <i>Industria alimentaria</i>	46
1.3.4.2 <i>Industria médico-farmacéutica</i>	47
1.3.4.3 <i>Biorremediación ambiental</i>	48
1.3.4.4 <i>Otras aplicaciones industriales</i>	49
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	55
3.1 Microorganismos probióticos	57
3.1.1 Cepas probióticas	57
3.1.2 Condiciones y medios de cultivo	58
3.1.2.1 <i>Medios de cultivo</i>	58
A- Género <i>Lactobacillus</i>	58
B- Género <i>Bifidobacterium</i>	59
C- Almacenamiento de las cepas	60
3.1.2.2 <i>Condiciones de cultivo</i>	60
A- Cultivo en medio líquido	60
B- Cultivo en medio sólido	61
3.2 Polímeros Microbianos	61
3.2.1 Polímeros microbianos de origen comercial	61
3.2.2 Polímeros microbianos obtenidos a nivel de laboratorio	62
3.2.2.1 <i>Obtención de Exopolisacárido de Paenibacillus jamilae CECT 5266</i>	62
A- Medio de cultivo	62
B- Producción del exopolisacárido	63
C- Extracción del EPS producido por <i>P. jamilae</i> CECT 5266	64
3.2.3 Preparación de los polímeros microbianos para la encapsulación	65
3.3 Encapsulación de microorganismos probióticos	66
3.3.1 Preparación de los concentrados bacterianos	66
3.3.2 Técnica de inmovilización	66
3.3.2.1 <i>Método de extrusión o goteo</i>	66
3.3.2.2 <i>Método del generador electrostático de goteo</i>	67
3.3.3 Determinación de características físicas de las perlas	69
3.3.3.1 <i>Determinación del tamaño de las perlas formadas</i>	69
3.3.3.2 <i>Observación de la morfología al microscopio electrónico de</i>	69

<i>barrido (SEM)</i>	
3.3.3.3 <i>Determinación de la temperatura de fusión de los geles de polímeros microbianos</i>	70
3.3.3.4 <i>Determinación de las características mecánicas de las perlas</i>	70
3.3.4 Optimización del método de desintegración de las perlas	71
3.3.5 Procedimiento de enumeración de microorganismos	72
3.3.6 Evaluación de la viabilidad de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular a largo plazo.	73
3.4 Estudios <i>in vitro</i> de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral.	74
3.4.1 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en diferentes pH	74
3.4.2 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en condiciones gastrointestinales simuladas.	75
3.4.2.1 <i>Optimización de las condiciones del ensayo mediante técnicas espectrofotométricas</i>	75
A- Crecimiento de cepas probióticas en medio líquido	75
B- Estudio del crecimiento puntual de las cepas probióticas frente a condiciones gastrointestinales simuladas	76
C- Evaluación de crecimiento de las cepas probióticas frente a la exposición secuencial en condiciones gastrointestinales simuladas mediante espectrofotometría.	77
3.4.2.2 <i>Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en condiciones gastrointestinales simuladas</i>	79
A – Cepas probióticas libres	80
B – Cepas probióticas inmovilizadas	80
3.4.3 Evaluación del efecto de condiciones gastrointestinales simuladas sobre propiedades probióticas en microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular.	81
3.4.3.1 <i>Obtención de masa microbiana</i>	82
3.4.3.2 <i>Efecto sobre el fenómeno de auto-agregación de los microorganismos</i>	82
3.4.3.3 <i>Efecto sobre la producción de peróxido de hidrógeno de los microorganismos</i>	83
3.5 Estudios <i>in vivo</i> de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral	84
3.5.1 Modelos de experimentación	84
3.5.1.1. <i>Animales de experimentación</i>	84
3.5.1.2. <i>Modelos de experimentación</i>	85
3.5.1.3. <i>Administración de las perlas y los microorganismos probióticos</i>	86
3.5.1.4 <i>Toma de muestras de animales de experimentación</i>	87
A-Heces	87

B-Biopsia	87
3.5.1.5 <i>Procesamiento de las muestras</i>	87
A-Heces	87
B-Biopsias	88
3.5.2 Evaluación del impacto de la administración de <i>L.plantarum</i> CRL 1815 encapsulado y sin encapsular sobre la microbiota fecal de las ratas	88
3.5.2.1 <i>Análisis mediante Hibridación in situ fluorescente (FISH)</i>	89
A- Procesamiento de las muestras para el análisis	89
B- Sondas empleadas en este estudio	89
C- Hibridación de las sondas a las muestras	91
D- Cuantificación de bacterias	92
3.5.3 Estudios de colonización y tránsito intestinal de <i>L.plantarum</i> CRL 1815 encapsulado y sin encapsular	93
3.5.3.1 <i>Extracción de ADN</i>	93
A-Heces	93
B-Órganos	95
C-Cultivos puros	95
3.5.3.2 <i>Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	96
3.5.3.3 <i>Control de calidad y cantidad de ADN</i>	98
3.5.3.4 <i>Técnica de análisis de comunidades: TTGE</i>	99
A-Preparación de los geles de acrilamida	101
B-Electroforesis	101
C-Tinción de los geles	101
D-Escisión de bandas de los geles	102
E-Análisis de los geles	102
3.5.3.5 <i>Secuenciación y análisis de secuencias</i>	103
A- Secuenciación del gen 16srRNA	103
B- Secuenciación de las bandas específicas producto de la escisión de los geles de poliacrilamida	103
C- Análisis de secuencias	103
3.5.4 Evaluación de la respuesta biológica derivada de la administración de perlas de <i>L.plantarum</i> CRL 1815	104
3.5.4.1 <i>Linfoproliferación en respuesta a mitógenos</i>	104
A-Medios de cultivo	104
B-Obtención de suspensiones de esplenocitos	106
C-Recuento de células viables y ajuste de la suspensión	106
D-Cultivo de esplenocitos	107
E-Medida de la linfoproliferación	108
3.6 Análisis estadístico	108
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111

4.1 Encapsulación de microorganismos probióticos	113
4.1.1 Empleo de polímeros microbianos para la formación de perlas	113
4.1.1.1 <i>Selección de las mezclas de polímeros para la inmovilización microbiana mediante el método de goteo</i>	113
4.1.1.2 <i>Obtención de cápsulas aplicando el generador electrostático de goteo y caracterización de las perlas</i>	114
4.1.2 Optimización del método de desintegración de las perlas	117
4.1.3 Efecto del procedimiento de formación de perlas en la viabilidad de las cepas probióticas	118
4.1.4 Determinación de la temperatura de fusión de los geles de polímeros microbianos	121
4.1.5 Determinación de las características mecánicas de las perlas con microorganismos probióticos	122
4.1.6 Evaluación de la viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular	124
4.2 Estudios <i>in vitro</i> de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral	130
4.2.1 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en diferentes pH	130
4.2.2 Optimización de las condiciones del estudio de supervivencia frente a condiciones gastrointestinales simuladas mediante técnicas espectrofotométricas	137
4.2.2.1 <i>Curva de crecimiento de las cepas probióticas</i>	137
4.2.2.2 <i>Evaluación del crecimiento de cepas probióticas frente a la exposición de condiciones gastrointestinales simuladas</i>	139
A-Ensayo en condiciones individuales	139
B-Resistencia de microorganismos probióticos a condiciones gastrointestinales ecuenciales	145
4.2.3 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en condiciones gastrointestinales simuladas	149
4.2.4 Evaluación del efecto sobre el fenómeno de auto-agregación de la acción de condiciones gastrointestinales simuladas en microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular	154
4.2.5 Evaluación del efecto sobre la producción de peróxido de hidrógeno de la acción de condiciones gastrointestinales simuladas en microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular	161
4.3 Efecto de la encapsulación de microorganismos probióticos en estudios <i>in vivo</i> administrados por vía oral.	166
4.3.1 Effect of free and encapsulated <i>L.plantarum</i> CRL 1815 on rat faecal microbiota composition	167
4.3.2 Estudios de colonización y tránsito intestinal de <i>L.plantarum</i> CRL 1815 encapsulado y sin encapsular	181
4.3.2.1 <i>Extracción de ADN y calidad de productos obtenidos</i>	184

4.3.2.2 Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	185
A- Amplificación y secuenciación del gen completo del 16SrRNA	186
B- Amplificación de las regiones V6-V8 para su análisis por TTGE	186
4.3.2.2 Electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE)	190
A-Análisis global de la biodiversidad microbiana de las muestras obtenidas tras la administración de <i>L.plantarum</i> CRL 1815 encapsulado y sin encapsular	191
B-Análisis de los perfiles filogenéticos de las muestras obtenidas tras la administración de <i>L.plantarum</i> CRL 1815 encapsulado y sin encapsular	198
C-Identificación de especies presentes en los perfiles tras la administración de <i>L.plantarum</i> CRL 1815 encapsulado y sin encapsular	204
4.3.3 Evaluación de la respuesta biológica derivada de la administración de perlas de <i>L.plantarum</i> CRL 1815	217
DISCUSIÓN GENERAL	221
CONCLUSIONES	229
BIBLIOGRAFÍA	235
ANEXO	251
Secuencia del gen 16S r RNA de la cepa probiótica	253
Secuencias de las bandas mayoritarias producto de la escisión de los geles de poliacrilamida	254

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Definiciones de probióticos	6
Tabla 2. Criterios a tener en cuenta para la selección de probióticos de aplicación comercial	7
Tabla 3. Algunos microorganismos probióticos	8
Tabla 4. Hábitats del género <i>Lactobacillus</i>	10
Tabla 5. Clasificación del género <i>Lactobacillus</i> según su perfil metabólico: Homofermentadores y heterofermentadores obligados	12
Tabla 6. Clasificación del género <i>Lactobacillus</i> según su perfil metabólico: Heterofermentadores facultativos	13
Tabla 7. Cepas descritas de <i>Lactobacillus</i> desde 2007 hasta la actualidad (no incluidas en las clasificaciones taxonómicas previas)	13
Tabla 8. Especies de <i>Bifidobacterium</i>	16
Tabla 9. Resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos en pediatría	26
Tabla 10. Algunos EPS bacterianos de importancia comercial	43

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 11. Composición por litro del medio MRS	58
Tabla 12. Suplementos para el crecimiento de <i>B. longum</i> ATCC BAA-999	59
Tabla 13. Solución de L-cisteína (45 g/L)	59
Tabla 14. Solución de Hemina (0,5 g/L)	59
Tabla 15. Solución de Vitamina K ₁	59
Tabla 16. Composición por litro del medio Leche-extracto de levadura	60
Tabla 17. Polímeros comerciales empleados en la encapsulación	61
Tabla 18. Composición del medio EP al 5%	62
Tabla 19. Métodos ensayados para la desintegración de las perlas	72
Tabla 20. Tampones ensayados para la desintegración de las perlas	72
Tabla 21. pH ensayado y tiempos de toma de muestra	74
Tabla 22. Condiciones ensayadas en el estudio	76
Tabla 23. Condiciones del ensayo empleadas con los lactobacilos	78
Tabla 24. Condiciones del ensayo empleadas con <i>B. longum</i> ATCC BAA-999	78
Tabla 25. Condiciones del ensayo empleadas con los lactobacilos	79
Tabla 26. Condiciones del ensayo empleadas con <i>B. longum</i> ATCC BAA-999	79
Tabla 27. Solución 17,4 mM de TMB	83
Tabla 28. Solución de 100 U/mL de peroxidasa	83
Tabla 29. Tabla resumen de los ensayos realizados en modelos murinos	86
Tabla 30. Detalle de las sondas para FISH empleadas en esta tesis	90
Tabla 31. Tampones de hibridación empleados en este estudio según las exigencias de hibridación	91
Tabla 32. Tampones de lavado empleados en este estudio según las exigencias de hibridación	92

Tabla 33. Oligonucleótidos empleados en esta tesis	97
Tabla 34. Composición de la mezcla de amplificación	97
Tabla 35. Condiciones de amplificación empleadas en esta tesis	98
Tabla 36. Composición para la preparación de 2 geles de poliacrilamida	101
Tabla 37. Composición del medio RPMI 1640 completo	105
Tabla 38. Concentración de la suplementación del medio RPMI 1640 completo	105

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 39. Distribución del tamaño de las cápsulas obtenidas mediante el método del generador electrostático de goteo (n=170)	116
Tabla 40. Tampones y métodos ensayados	117
Tabla 41. Efecto del método de inmovilización en microorganismos probióticos inmovilizados con Xantano:Gelano (1%:0,75%) (n=3)	119
Tabla 42. Efecto del método de inmovilización en microorganismos probióticos inmovilizados con Jamilano:Gelano (1%:1%) (n=3)	119
Tabla 43. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95%.	120
Tabla 44. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95%.	127
Tabla 45. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95% de la bacteria difundida al medio.	131
Tabla 46. Condiciones del ensayo	145
Tabla 47. Condiciones del ensayo de supervivencia	149
Tabla 48. Influencia de los factores estudiados y sus interacciones sobre los microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular. Evaluación estadística.	153
Tabla 49. Resultados de auto-agregación de <i>L. plantarum</i> CRL 1815 sin encapsular.	155
Tabla 50. Resultados de auto-agregación de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 sin encapsular.	155
Tabla 51. Resultados de auto-agregación de <i>B. longum</i> ATCC BAA-999 sin encapsular.	156
Tabla 52. Resultados de auto-agregación de <i>L. plantarum</i> CRL 1815 encapsulado	157
Tabla 53. Resultados de auto-agregación de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 encapsulado	158
Tabla 54. Resultados de auto-agregación de <i>B. longum</i> ATCC BAA-999 encapsulado	159
Tabla 55. Producción de peróxido de hidrógeno de las cepas probióticas sin encapsular	162
Tabla 56. Producción de peróxido de hidrógeno de las cepas probióticas encapsuladas.	163
Table 57. FISH probes employed in this study	168
Table 58. Modifications of the fecal microbial population after the administration of 1%Xanthan gum+0,75%Gellan gum beads with <i>L.plantarum</i> CRL 1815	169
Table 59. Modifications of the fecal microbial population after the administration of 1%Gellan gum+1% Jamilan beads with <i>L.plantarum</i> CRL 1815	170
Tabla 60. Nomenclatura de las muestras fecales del estudio Xantano:Gelano	182
Tabla 61. Nomenclatura de las muestras fecales del estudio Jamilano:Gelano	183
Tabla 62. Nomenclatura de las muestras de órganos del estudio Xantano:Gelano	183
Tabla 63. Nomenclatura de las muestras de órganos del estudio Jamilano:Gelano	184
Tabla 64. Producto de PCR de muestras fecales del estudio Xantano:Gelano	188
Tabla 65. Producto de PCR de muestras fecales del estudio Jamilano:Gelano	189
Tabla 66. Producto de PCR de muestras de órganos del estudio Xantano:Gelano	189
Tabla 67. Producto de PCR de muestras de órganos del estudio Jamilano:Gelano	190

Tabla 68. Resultados de secuenciación de bandas mayoritarias/Heces	210
Tabla 69. Resultados de secuenciación de bandas mayoritarias/Órganos	212
Tabla 70. Resultados de secuenciación de bandas escindidas del putativo <i>L. plantarum</i> CRL 1815	213
Tabla 71. Resultados de secuenciación de bandas escindidas del putativo <i>L. plantarum</i> CRL 1815	214
Tabla 72. Resultados de la linfoproliferación en respuesta a mitógenos	218

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Fig. 1 Imagen al microscopio de <i>L.acidophilus</i>	14
Fig. 2 Imagen al microscopio de <i>B.longum</i>	15
Fig. 3 Diagrama de flujo de la encapsulación de probióticos mediante las técnicas de emulsión y extrusión o goteo. Ejemplo realizado empleando alginato como matriz de encapsulación.	32
Fig. 4 Esquema del proceso de atomización	35
Fig. 5 Métodos de pulverización de probióticos	37
Fig. 6 Estructura del alginato	39
Fig. 7 Estructura del κ-carragenano	3
Fig. 8 Estructura del quitosano	40
Fig. 9 Estructura del almidón (amilosa)	40
Fig. 10 Estructura del gelano	41
Fig. 11 Estructura del xantano	42
Fig. 12 Algunos productos que llevan EPS como aditivos	47

MATERIAL Y MÉTODOS

Fig. 13 Fotografías al microscopio electrónico de barrido. a) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ; b) <i>Bifidobacterium longum</i> .	57
Fig. 14 Fermentador Biostat B en el que se cultivó <i>P.jamilae</i> CECT 5266	63
Fig. 15 Proceso de extracción del jamilano a partir de un cultivo de <i>P. jamilae</i> CECT 5266	64
Fig. 16 Esquema del método de encapsulación por goteo	67
Fig.17 Esquema del método del generador electrostático de goteo	68
Fig. 18 Detalle del proceso de encapsulación mediante generador electrostático de goteo. a) Dispositivo. b) Caída de la gota y recogida. c) Formación de la gota.	68
Fig. 19 Microscopio estéreo para la toma de imágenes de perlas	69
Fig. 20 Cabezal de compresión acoplado al DMA para estudios de compresión	71
Fig. 21 Esquema de toma de muestra en la evaluación de la viabilidad a largo plazo	73
Fig. 22 Esquema de las metodologías empleadas en la evaluación de la supervivencia microbiana frente a condiciones gastrointestinales simuladas	81
Fig. 23 Ratas Wistar empleadas en el estudio	85
Fig. 24 Microscopio de fluorescencia Nikon E400 Eclipse	93
Fig. 25 Marcadores de peso molecular empleados. A. DNA Molecular Weight Marker II; B. AmpliSize™ Molecular Ruler	99
Fig. 26 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio Rad)	100

RESULTADOS

Fig. 27 Medias perlas formadas con las mezclas de pululano y gelano.	114
Fig. 28 Morfología y tamaño de las perlas obtenidas con diferentes mezclas poliméricas (amplificación 1x). a) Xantano:Gelano goteo simple. b) Xantano:Gelano generador electrostático de goteo. c) Jamilano:Gelano goteo simple. d) Jamilano:Gelano generador electrostático de goteo.	115
Fig. 29 Imágenes del SEM de perlas obtenidas mediante el generador electrostático de goteo: a), c) Perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%). b), d) Perlas de Jamilano:Gelano	116

(1%:1%)

- Fig. 30** DSC termogramas de las soluciones de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) 121
- Fig. 31** Curva tensión-deformación de 3 réplicas (1,2,3) experimentales de perlas. A. Xantano:Gelano (1%:0,75%); B. Jamilano:Gelano (1%:1%) 122
- Fig. 32** Supervivencia de las cepas probióticas inmovilizadas y sin inmovilizar almacenadas a 25°C durante 90 días. A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-999 125
- Fig. 33** Supervivencia de las cepas probióticas inmovilizadas y sin inmovilizar almacenadas a 4°C durante 90 días. A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-999 126
- Fig. 34** Gráficos de interacción Temperatura (Ta)-Tiempo de almacenamiento (To). A. Perlas de *L. plantarum* CRL 1815 B. Perlas de *L. rhamnosus* ATCC 53103 128
- Fig. 35** Gráficos de interacción Temperatura (Ta)-Tiempo de almacenamiento (To). A. *L. plantarum* CRL 1815 libre B. *B. longum* ATCC BAA-999 libre. 129
- Fig. 36** Efecto de diferentes pH (2; 3,5; 5; 6,5) en la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular con Xantano:Gelano (1%:0,75%). A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-999 132
- Fig. 37** Efecto de diferentes pH (2; 3,5; 5; 6,5) en la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular con Jamilano:Gelano (1%:1%). A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-999 133
- Fig. 38** Gráfico de interacción material de encapsulación-Tiempo de exposición de *B. longum* ATCC BAA-999 difundido de las perlas al medio. 134
- Fig. 39** Gráficos de interacción pH-Tiempo de exposición de la bacteria difundida de las perlas al medio. A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-999 135
- Fig. 40** Curvas de crecimiento en AEROBIOSIS de las cepas probióticas. A. 550 nm B. 650 nm 137
- Fig. 41** Curvas de crecimiento en ANAEROBIOSIS de las cepas probióticas. A. 550 nm B. 650 nm 138
- Fig. 42** Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes pH: A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-99 140
- Fig. 43** Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes concentraciones de pepsina: A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-99 141
- Fig. 44** Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes concentraciones de pancreatina: A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-99 142
- Fig. 45** Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes concentraciones de bilis: A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-99 143
- Fig. 46** Estudio secuencial de crecimiento frente a condiciones gastrointestinales simuladas de *L. plantarum* CRL 1815. A. 2-2-2 B. 4-2-2 146
- Fig. 47** Estudio secuencial de crecimiento frente a condiciones gastrointestinales simuladas de *L. rhamnosus* ATCC 53103. A. 2-2-2 B. 4-2-2 147
- Fig. 48** Estudio secuencial de crecimiento frente a condiciones gastrointestinales simuladas de *B. longum* ATCC BAA-999. 148
- Fig. 49** Efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas en la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular con Xantano:Gelano (1%:0,75%)=XG y Jamilano:Gelano (1%:1%)=JG tras una exposición SECUENCIAL. A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-999 150
- Fig. 50** Efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas en la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular con Xantano:Gelano (1%:0,75%)=XG 151

y Jamilano:Gelano (1%:1%)=JG tras una exposición NO SECUENCIAL. A. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 B. <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 C. <i>B. longum</i> ATCC BAA-999	
Fig. 51 Bacterias productoras (a) y no productoras (b) de peróxido de hidrógeno. a) <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 b) <i>L. plantarum</i> CRL 1815	164
Fig. 52 Modifications of the fecal microbial population during the 10-day the Xanthan:Gellan gum test. A. Control (T) B. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 (B) C. Beads of Xanthan:Gellan gum (C.V.) D. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 beads of Xanthan:Gellan gum (C.B.). *Significantly different from day 1 within the same probe (p<0.05)	171
Fig. 53 Modifications of the fecal microbial population during the 10-day Jamilan:Gellan gum test. A. Control (T) B. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 (B) C. Beads of Jamilan:Gellan gum (C.V.) D. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 beads of Jamilan:Gellan gum (C.B.). *Significantly different from day 1 within the same probe (p<0.05)	172
Fig. 54 Modification of the fecal microbiota population relative to the total bacteria population during the Xanthan:Gellan gum test. A. Control (T) B. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 (B) C. Beads of Xanthan:Gellan gum (CV) D. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 beads of Xanthan:Gellan gum (CB)	175
Fig. 55 Modification of the fecal microbiota population relative to the total bacteria population during the Jamilan:Gellan gum test. A. Control (T) B. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 (B) C. Beads of Jamilan:Gellan gum (CV) D. <i>L. plantarum</i> CRL 1815 beads of Jamilan:Gellan gum (CB)	176
Fig. 56 Images at fluorescent microscope of rat faecal samples with different probes. a) Lab158 b) Bif164 c)Prop853 d)EcyI387	179
Fig. 57 Muestras de ADN de procedencia fecal en gel de agarosa 0,8%	185
Fig. 58 Productos de PCR procedentes de ADN fecal en gel de agarosa 2%	187
Fig. 59 Productos de PCR procedentes de ADN de órganos en gel de agarosa 2%. Arriba: Jamilano:Gelano (1%:1%). Abajo: Xantano:Gelano (1%:0,75%)	187
Fig. 60 A. Estudio Xantano:Gelano B. Estudio Jamilano:Gelano. T: Testigo B: Bacteria, CV: Capsulas no probióticas CB: Cápsulas probióticas D: Duodeno I: Íleon C: Colon. Los órganos procedieron del mismo animal.	191
Fig. 61 Número de bandas observadas por muestra fecal. A. Estudio de Xantano:Gelano B. Estudio de Jamilano:Gelano.	192
Fig. 62 Número de bandas observadas por muestra de órganos. A. Estudio de Xantano:Gelano B. Estudio de Jamilano:Gelano	193
Fig. 63 Intensidad media de las bandas observadas por muestra fecal. A. Estudio de Xantano:Gelano B. Estudio de Jamilano:Gelano	194
Fig. 64 Intensidad media de las bandas observadas por muestra de órganos. A. Estudio de Xantano:Gelano B. Estudio de Jamilano:Gelano	195
Fig. 65 Análisis en TTGE de muestras fecales del estudio de Xantano:Gelano	200
Fig. 66 Análisis en TTGE de muestras fecales del estudio de Jamilano:Gelano	201
Fig. 67 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Xantano:Gelano	202
Fig. 68 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Jamilano:Gelano	203
Fig. 69 Análisis en TTGE de muestras de heces del estudio de Xantano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida	205
Fig. 70 Análisis en TTGE de muestras de heces del estudio de Jamilano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida	206
Fig. 71 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Xantano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida	207
Fig. 72 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Jamilano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida	208
Fig. 73 Árbol filogenético realizado con las secuencias más próximas obtenidas de muestras fecales y de órganos del putativo <i>L. plantarum</i> CRL 1815	216

ABREVIATURAS UTILIZADAS

APS: Persulfato amónico
BSH: Hidrolasa de sales biliares
CD: Enfermedad de Crohn
CIC: Centro de Instrumentación Científica
ConA: Concanavalina A
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DMA: Análisis mecánico diferencial
DO₆₀₀: Densidad óptica a $\lambda=600$ nm
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
EDTA: Ácido Etilen-diamino-tetraacético
EFSA: European Food Safety Authority
EPS: Exopolisacárido
FDA: US Food and Drug Administration
FISH: Fluorescence *in situ* hybridisation
GI: Gastrointestinal
GRAS: Generally Recognized As Safe
IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal o "Inflammatory bowel disease"
LAB: Lactic acid bacteria o bacterias del ácido láctico
LPS: lipopolisacárido
NK: Células "Natural Killer"
PANC.: Pancreatina
PBS: Tampón Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PEP.: Pepsina
PMN: Neutrófilos polimorfonucleares
SB: Bilis
SEM: Microscopía Electrónica de barrido
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
Tf: Temperatura de fusión
Tm: Temperatura de fusión del ADN
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TE: Tris-EDTA
TMB: 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina
TTGE: Temporal Temperature-gradient Gel Electrophoresis
UC: Colitis Ulcerosa

INTRODUCCIÓN

1.1 Probióticos

1.1.1 Evolución del concepto “probiótico”

Fue a partir del siglo XIX cuando se realizaron importantes descubrimientos gracias al trabajo de numerosos científicos, principalmente microbiólogos, que permitieron un mayor conocimiento de la microbiota del cuerpo humano. Escherich (1885) fue el primero en reconocer la importancia del estudio de los microorganismos que se encuentran en las heces normales y en el tracto gastrointestinal permitiendo un mayor entendimiento de la fisiología de la digestión y de la patología y terapia de enfermedades intestinales de origen microbiano. En 1900 dos microbiólogos, Tissier y Moro, describieron sus hallazgos en aislados de heces de bebés que eran alimentados con leche materna. Tissier comprobó que los microorganismos anaerobios aislados tenían, en términos generales, un comportamiento determinado al teñirse y una morfología similar a los lactobacilos, sin embargo, un gran número de ellos presentaban una forma bifurcada o de “Y”, de manera que los denominó *Bacillus bifidus*. Moro, por su parte, postuló que el aislado, nombrado *Bacillus acidophilus* debido a su inusual tolerancia ácida, provenía del pecho materno y se alojaba en la cavidad oral del neonato para luego pasar a formar parte del contenido intestinal. Más tarde, en 1908, Tissier también demostró que *B. bifidus* predominaba en las heces de bebés alimentados con leche materna con 3 días de vida, en oposición a los bebés alimentados con leche de fórmula en los cuales se detectó *B. acidophilus* como el microorganismo predominante (Vasiljevic & Shah, 2008).

Al mismo tiempo, Elie Metchnikoff (1845-1916) ganador del premio Nobel en 1908 por sus estudios sobre fagocitosis, destacó el efecto beneficioso que ciertas bacterias podían ejercer al implantarse en el cuerpo humano. Este científico, interesado en el proceso de envejecimiento, sugirió que la comunidad microbiana presente en el intestino grueso humano era una fuente de sustancias tóxicas para el sistema nervioso y vascular del hospedador. Estas sustancias tóxicas serían absorbidas a través de la pared intestinal y circularían por la sangre contribuyendo al proceso de envejecimiento. La

microbiota intestinal, por tanto, sería la responsable de lo que denominó como “autointoxicación”, al ser estas bacterias capaces de degradar proteínas mediante el proceso de putrefacción, liberando amonio, aminas e indoles. Metchnikoff determinó que pequeñas concentraciones de estos productos bacterianos podían escapar de la detoxificación por parte del hígado, entrando en la circulación sanguínea. Como remedio a este proceso planteó la posibilidad de sustituir, o al menos disminuir, el número de estas bacterias putrefactoras mediante la administración oral de cultivos de microorganismos “beneficiosos”, con capacidad de implantarse en el tubo digestivo, fermentar carbohidratos y con reducida actividad proteolítica. Las bacterias del ácido láctico o LABs (“lactic acid bacteria”) fueron seleccionadas para este propósito por ser microorganismos que fermentan la leche mediante un proceso natural, previniendo con ello el crecimiento de bacterias no ácido tolerantes, incluyendo las especies proteolíticas. Si la fermentación láctica prevenía la putrefacción de la leche, posiblemente tuviera el mismo efecto en el tracto digestivo. De hecho, el consumo de productos lácteos en Europa del Este con su *Bacillus bulgaricus* asociado a la longevidad de su población fue una prueba de su eficacia para su introducción en Europa occidental, naciendo con ello el concepto de probióticos (Tannock, 2002).

Investigaciones posteriores confirmaron que el consumo de LAB tenía un efecto beneficioso sobre la salud. Por ejemplo, en los años 30 se emplearon preparaciones con *L. acidophilus* para aliviar el estreñimiento, mientras que en Japón, Shirota (1930) aisló y cultivó con éxito una cepa de *Lactobacillus* capaz de sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal. Esa cepa se identificó como *Lactobacillus casei* strain Shirota y fue empleada con éxito en la producción de un producto lácteo fermentado conocido como “Yakult” (Fooks & Gibson, 2002; Vasiljevic & Shah, 2008). Sin embargo, no fue hasta los años 50-60 que se introdujo el concepto de probiótico.

La palabra **probiótico** deriva de dos palabras griegas “προ” y “βίος” que significa “pro-vida o de por vida” y fue introducida como antónimo de la palabra “antibiótico”. En 1954 Vergin propuso que el desequilibrio causado en el cuerpo por un tratamiento antibiótico podría restablecerse con una dieta rica en probióticos, sugerencia considerada por muchos investigadores como la primera referencia hacia los probióticos tal y como se entienden en la

actualidad. De manera similar, Kolb (1955) reconoció los efectos perjudiciales de la terapia antibiótica y propuso su prevención con probióticos. Ya en 1965, Lilly y Stilwell asignaron el término de probiótico a *“aquellas sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos”* (Vasiljevic & Shah, 2008). Fuller, en 1989, redefinió la denominación de probiótico como *“suplemento alimentario formado por microorganismos vivos que afectan de manera beneficiosa al hospedador mediante la mejora de su equilibrio intestinal”* (Fuller, 1991), definición que enfatizaba la viabilidad del microorganismo para su administración así como también introducía el concepto de suplemento alimentario. Más tarde, en 1999, Salminen ofrece una nueva visión del concepto probiótico al definirlo como *“preparaciones microbianas o componentes de células microbianas que ejercen un efecto beneficioso en la salud y bienestar del hospedador”* e incorporar el concepto de bacteria no viable a la definición (Salminen, *et al.*, 1999). Finalmente, la definición más aceptada hoy día se consensuó en el año 2002 en una reunión de expertos convocada por la FAO/WHO (“Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization”) para la elaboración de una “Guía para la evaluación de probióticos en los alimentos”, donde se definieron como *“microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedador”* (FAO/WHO, 2002). Algunas de las definiciones propuestas para los microorganismos probióticos se incluyen en la tabla 1.

Aunque en la presente tesis no se hayan empleado sustancias prebióticas ni simbióticos, es de interés conocer su definición por su estrecha relación con los microorganismos probióticos. Mientras que el término **prebióticos** alude a *“ingredientes alimentarios no digeribles, que afectan al hospedador de manera beneficiosa mediante la estimulación del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de especies presentes en el colon”* (Gibson & Roberfroid, 1995), los cuales van a promover el desplazamiento de organismos no deseables como clostridios o coliformes, por otros beneficiosos como lactobacilos o bifidobacterias; el término **simbiótico**, más reciente, define a *“mezclas de probióticos y prebióticos que afectan de manera beneficiosa al hospedador mediante la mejora de la supervivencia e implantación en el tracto*

gastrointestinal de suplementos dietéticos de microorganismos vivos” (Roberfroid, 1998).

Tabla 1. Definiciones de probióticos.

Año	Definición	Fuente
1954	Probióticos como antagonista de los antibióticos	(Vergin, 1954)
1955	Los efectos perjudiciales de los antibióticos se pueden prevenir con terapia con probióticos	(Kolb, 1955)
1965	Aquellas sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos	(Lilly & Stillwel, 1965)
1974	Organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio de la microbiota intestinal	(Parker, 1974)
1991	Complemento alimentario microbiano vivo que ejerce una influencia beneficiosa sobre el crecimiento del animal hospedador mejorando el equilibrio de su microbiota intestinal.	(Fuller, 1991)
1992	Mono o policultivo de microorganismos vivos que, en el hombre o en el animal, poseen una influencia beneficiosa mejorando las propiedades de la microbiota endógena.	(Havenaar & Huis In't Veld, 1992)
1996	Cultivo microbiano vivo o producto lácteo cultivado que ejerce un efecto positivo sobre la salud y la nutrición del huésped	(Salminen, 1996)
1996	Microorganismos vivos que, tras su ingesta en determinado número, provocan beneficios para la salud independientemente de sus propiedades nutritivas	(Schaafsma, 1996)
1999	Preparaciones microbianas o componentes de células microbianas que ejercen un efecto beneficioso en la salud y bienestar del hospedador	(Salminen, <i>et al.</i> , 1999)
2002	Microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedador	(FAO/WHO, 2002)

1.1.2 Selección de bacterias probióticas

Para poder considerar a un microorganismo como probiótico éste ha de cumplir algunos requisitos (Ramos-Cormenzana, *et al.*, 2005; Saulnier, *et al.*, 2009):

- Estar perfectamente caracterizado a nivel de género, especie y cepa y depositado en una colección de cultivo internacional y reconocida.
- Ser seguro para el hospedador, determinado mediante ensayos *in vitro* y/o en animales de experimentación si es necesario.
- Ser viables en el momento de su consumo, aunque se ha reconocido que las células no viables pueden mediar algunos efectos beneficiosos a nivel fisiológico.

- Ser capaz de sobrevivir a su paso por el tracto gastrointestinal, determinándolo mediante una serie de pruebas estándar:
 - Resistencia al pH gástrico y a sales biliares
 - Capacidad de adhesión a la mucosa y/o células epiteliales humanas o a líneas celulares
 - Actividad antimicrobiana frente a potenciales microorganismos patógenos
- Deben proporcionar algún beneficio fisiológico demostrado mediante estudios llevados a cabo en los organismos diana.

Algunos criterios propuestos para la selección de microorganismos probióticos con aplicaciones comerciales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios a tener en cuenta para la selección de probióticos de aplicación comercial (Vasiljevic & Shah, 2008).

Criterio	Propiedad
Seguridad	Origen Patogenia e infectividad (ausencia) Factores de virulencia--toxicidad, actividad metabólica y propiedades intrínsecas como la resistencia a antibióticos
Tecnológico	Cepas genéticamente estables Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento Buenas propiedades sensoriales Resistencia a fagos Producción a gran escala
Funcional	Tolerancia al ácido y a los jugos gástricos Tolerancia a la bilis Adhesión a la mucosa Efectos beneficiosos sobre la salud validados y documentados
Fisiológicos (deseables)	Inmunomodulación Actividad antagonista frente a patógenos gastrointestinales como <i>Helicobacter pylori</i> o <i>Candida albicans</i> Metabolismo del colesterol y de la lactosa Propiedades antimutagénicas y anticancerígenas.

Son varios los géneros que incluyen miembros que se consideran como microorganismos probióticos (como el género *Bacillus* y también levaduras del género *Saccharomyces*), aunque el grupo más numeroso y más profundamente estudiado es el de las bacterias del ácido láctico o LABs.

Algunas de estas especies probióticas así como los efectos que se les adjudican se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Algunos microorganismos probióticos (Ouwehand, *et al.*, 2002)

Género	Especie	Cepa	Efecto
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Disminuye la diarrea asociada a antibióticos
	<i>casei</i>	Shirota	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> Reduce la recurrencia del cáncer de vejiga Efectos sobre el sistema inmune
	<i>plantarum</i>	299v	Reducción del colesterol tipo LDL Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
	<i>johnsonii</i>	La1	Mejora de la acción de vacunas orales Disminuye la colonización por <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>reuteri</i>	SD2112	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i>
	<i>rhamnosus</i>	GG	Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> Efectos sobre el sistema inmune Tratamiento y prevención de la alergia Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
	<i>salivarius</i>	UCC118	Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	
<i>lactis</i>		Bb12	Tratamiento de la alergia Acorta la diarrea asociada a <i>Rotavirus</i> Disminuye la incidencia de la “diarrea del viajero” Mejora la acción de vacunas orales
<i>longum</i>		BB536	Efectos sobre el sistema inmune Efecto antitumoral en cáncer de colon e hígado
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Nisle 1917	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>boulardii</i>	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>	JS	Convierte el ácido linoleico en ácido linoleico conjugado.

1.1.3 Bacterias del Ácido Láctico o LAB

Las LAB se describen normalmente como microorganismos Gram positivos, carentes de citocromos y preferentemente anaerobios aunque

aerotolerantes, exigentes, ácido-tolerantes y fermentadores estrictos, produciendo ácido láctico como producto principal (Stiles & Holzapfel, 1997).

En la actualidad se dispone de la secuencia completa del genoma de algunos componentes de la familia de las LABs, como es el caso de *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* y *Streptococcus thermophilus*, entre otros. El conocimiento del genoma de los microorganismos probióticos es de gran relevancia ya que proporciona una herramienta valiosa para un mayor y más profundo entendimiento de sus mecanismos de acción, y con ello permite conseguir un mayor potencial de aplicación de los mismos, ya sea en la industria alimentaria o farmacéutica (Aguilera, *et al.*, En prensa). Gracias al conocimiento de su secuencia se ha podido determinar qué genes están implicados en procesos tan relevantes como la resistencia a patógenos, su capacidad de colonización y adhesión al epitelio intestinal o el mecanismo por el cual producen una reducción en situaciones de intolerancia a la lactosa (Ramos-Cormenzana, *et al.*, 2005).

Los géneros más importantes dentro de este grupo son *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*, aunque sin duda los géneros más estudiados de este grupo son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y por ello se desarrollan a continuación.

1.1.3.1 Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es muy diverso, y fue inicialmente propuesto por Beijerinck en 1901 (Vandamme, *et al.*, 1996). Este género pertenece al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae* y sus géneros más cercanos son *Paralactobacillus* y *Pediococcus*. (Garrity, *et al.*, 2004).

Sus características taxonómicas comunes se limitan a su forma bacilar (aunque al crecer en determinadas condiciones pueden parecer cocos) y a su habilidad para producir ácido láctico como producto exclusivo o mayoritario de

su metabolismo. Son microorganismos de naturaleza ubicua, localizados en aquellos ambientes ricos en carbohidratos (Tabla 4).

Tabla 4. Hábitats del género *Lactobacillus* (Stiles & Holzapfel, 1997).

Hábitat	Lugar
Humanos	Cavidad oral
	Tracto gastrointestinal
	Vagina
Otros hábitats	Plantas y material de plantas
	Tierra, agua, aguas residuales y estiércol
	Fermentaciones alimentarias (leche, carne y vegetales)
	Cereales
	Ensilado
Alimentos deteriorados	Cerveza
	Purés de fruta y grano
	Pescado marinado
	Azúcar procesado
	Leche
	Carne y productos cárnicos
	Bebidas fermentadas

En cuanto a sus características taxonómicas, son Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos (incluso aunque algunas cepas puedan presentar actividad pseudo-catalasa) y con un tamaño entre 0,5 y 1,2 μm (Figura 1). Son fermentadores, quimio-organotrofos y microaerófilos, de manera que en general crecen pobremente en presencia de O_2 y su crecimiento se ve favorecido con una tensión de CO_2 al 5%. En cuanto al contenido en Guanina + Citosina (G+C) de su genoma, generalmente puede oscilar entre 32-53 mol%. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-40°C, pero pueden crecer en un rango de 5 a 53°C. El rango óptimo de pH para su crecimiento es 5,5-5,8 pero en general pueden soportar e incluso crecer a pH inferiores y superiores, hasta un pH máximo de 7,2. Se les considera microorganismos acidúricos, capaces de disminuir el pH de los alimentos que los contiene hasta 4, siempre y cuando contenga un carbohidrato fermentable

en él, teniendo como consecuencia, en ocasiones, la supresión del crecimiento o la muerte de otras bacterias presentes.

Según la revisión de taxonomía de este género realizada por Felis y Dellaglio en 2007, existen 106 especies válidamente descritas dentro de este grupo, a las que se les han sumado 29 especies descritas desde 2007 hasta la actualidad (Tablas 5, 6 y 7). Su clasificación ha sido revisada en numerosas ocasiones, ya sea en base a análisis filogenéticos, pruebas fenotípicas, proteínas celulares totales o de componentes de la pared celular (Felis & Dellaglio, 2007; Stiles & Holzapfel, 1997). Su estudio filogenético clásico divide al género en 3 grupos **grupos filogenéticos principales**:

1. Grupo de *L. delbrueckii*: Contiene la especie *L. delbrueckii*, especie tipo del género *Lactobacillus*, e incluye principalmente, aunque no exclusivamente, a los lactobacilos homofermentadores.
2. Grupo *L. casei-Pediococcus*: formado por especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Comprende homofermentadores obligados así como también heterofermentadores facultativos y obligados.
3. Grupo *Leuconostoc*: Incluye algunos lactobacilos heterofermentadores obligados y ha sido, posteriormente, subdividido en 3 géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*.

La descripción de una gran cantidad de especies dentro de este género en los últimos años y su consiguiente revisión filogenética ha llevado a una división de estos grupos en otros más pequeños, cuyo número varía de 8 a 16 según el autor (Felis & Dellaglio, 2007).

En cuanto a su **perfil fisiológico/metabólico** (Tablas 5 y 6), se clasifican en 3 grupos:

1. Homofermentadores obligados: fermentan glucosa (hexosas) exclusivamente a ácido láctico mediante la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, sin embargo no pueden fermentar pentosas o gluconato por su carencia en la enzima fosfocetolasa. Lactobacilos característicos de este grupo son *L. delbrueckii* y *L. acidophilus*.
2. Heterofermentadores facultativos: fermentan hexosas a ácido láctico por la ruta de Embden-Meyerhof o a ácidos láctico, acético y fórmico y etanol en situaciones de limitación de glucosa. También pueden fermentar pentosas, para producir ácidos láctico y acético, y gluconato,

ya que poseen las enzimas aldolasa y fosfoacetolasa. Microorganismos importantes de este grupo son *L.casei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*, habiéndose empleado estos 2 últimos en la presente tesis.

3. Heterofermentadores obligados: fermentan hexosas a ácido láctico, acético y/o a etanol y CO₂ mediante la ruta del fosfogluconato. La producción de gas a partir de glucosa es característica de este tipo de bacterias. Fermentan también pentosas a ácido láctico y acético mediante esta ruta. Este grupo está generalmente asociado a bacterias responsables de la descomposición de los alimentos.

Tabla 5. Clasificación del género *Lactobacillus* según su perfil metabólico: Homofermentadores y heterofermentadores obligados (adaptación de Felis y Dellaglio, 2007)

Homofermentadores obligados				
<i>L.acidophilus</i>		<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>		<i>L.manihotivorans</i>
<i>L.amylolyticus</i>		<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>L.mindensis</i>
<i>L.amilophilus</i>		<i>L.equi</i>		<i>L.nagelii</i>
<i>L.amylotrophicus</i>		<i>L.farciminis</i>		<i>L.pantheris</i>
<i>L.amylovorus</i>		<i>L.gallinarum</i>		<i>L.ruminis</i>
<i>L.animalis</i>		<i>L.gasseri</i>		<i>L.saerimneri</i>
<i>L.aviarus</i> subsp. <i>araffinosus</i>		<i>L.helveticus</i>		<i>L.salivarus</i>
<i>L.aviarus</i> subsp. <i>aviarus</i>		<i>L.iners</i>		<i>L.satsumensis</i>
<i>L.catenaformis</i>		<i>L.johnsonii</i>		<i>L.sharpae</i>
<i>L.concavus</i>		<i>L.kalixensis</i>		<i>L.tucceti</i>
<i>L.crispatus</i>		<i>L.kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>		<i>L.ultunensis</i>
<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		<i>L.kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>		<i>L.vermoldensis</i>
<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>		<i>L.mali</i>		<i>L.vitulinus</i>
Heterofermentadores obligados				
<i>L.acidifarinae</i>	<i>L.fructivorans</i>	<i>L.lindneri</i>	<i>L.parabrevis</i>	<i>L.rossiae</i>
<i>L.antri</i>	<i>L.frumenti</i>	<i>L.malefermentans</i>	<i>L.parabuchneri</i>	<i>L.sanfranciscensis</i>
<i>L.brevis</i>	<i>L.gastricus</i>	<i>L.mucosae</i>	<i>L.paracollinoides</i>	<i>L.siliginis</i>
<i>L.buchneri</i>	<i>L.hilgardii</i>	<i>L.namurensis</i>	<i>L.parakefiri</i>	<i>L.suebicus</i>
<i>L.collinoides</i>	<i>L.ingluviei</i>	<i>L.oligofermentans</i>	<i>L.pontis</i>	<i>L.vaccinostercus</i>
<i>L.diolivorans</i>	<i>L.kefiri</i>	<i>L.oris</i>	<i>L.psittaci</i>	<i>L.vaginalis</i>
<i>L.fermentum</i>	<i>L.kunkeei</i>	<i>L.panis</i>	<i>L.reuteri</i>	<i>L.zymae</i>

**Tabla 6. Clasificación del género *Lactobacillus* según su perfil metabólico:
Heterofermentadores facultativos (adaptación de Felis y Dellaglio, 2007)**

Heterofermentadores facultativos		
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. paraplantarum</i>
<i>L. acidipiscis</i>	<i>L. hammesii</i>	<i>L. pentosus</i>
<i>L. agilis</i>	<i>L. hamsteri</i>	<i>L. perolens</i>
<i>L. algidus</i>	<i>L. harbinensis</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>
<i>L. apodemi</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. rennini</i>
<i>L. bif fermentans</i>	<i>L. jensenii</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. kimchii</i>	<i>L. sakei</i> subsp. <i>Carnosus</i>
<i>L. coleohominis</i>	<i>L. kitasatonis</i>	<i>L. sakei</i> subsp. <i>Sakei</i>
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. sobrius</i>
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>L. nantesis</i>	<i>L. spicheri</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. vini</i>
<i>L. formicalis</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. zaeae</i>
<i>L. fuchuensis</i>	<i>L. paralimentarius</i>	

Tabla 7. Cepas descritas de *Lactobacillus* desde 2007 hasta la actualidad (no incluidas en las clasificaciones taxonómicas previas)

Cepa	Referencia	Cepa	Referencia
<i>L. aquaticus</i>	(Mañes-Lázaro, et al., 2009b)	<i>L. kisonensis</i>	(Watanabe, et al., 2009)
<i>L. bobalius</i>	(Mañes-Lázaro, et al., 2008a)	<i>L. nodensis</i>	(Kashiwagi, et al., 2009)
<i>L. cacaonum</i>	(De Bruyne, et al., 2009)	<i>L. oeni</i>	(Mañes-Lázaro, et al., 2009a)
<i>L. camelliae</i>	(Tanasupawat, et al., 2007)	<i>L. otakiensis</i>	(Watanabe, et al., 2009)
<i>L. capillatus</i>	(Chao, et al., 2008)	<i>L. parafarraginis</i>	(Endo & Okada, 2007b)
<i>L. ceti</i>	(Vela, et al., 2008)	<i>L. rapi</i>	(Watanabe, et al., 2009)
<i>L. composti</i>	(Endo & Okada, 2007a)	<i>L. secaliphilus</i>	(Ehrmann, et al., 2007)
<i>L. crustorum</i>	(Scheirlinck, et al., 2007)	<i>L. senmaizukei</i>	(Hiraga, et al., 2008)
<i>L. equicursoris</i>	(Morita, et al., 2010)	<i>L. similis</i>	(Kitahara, et al., 2010)
<i>L. equigenerosi</i>	(Endo, et al., 2008)	<i>L. succicola</i>	(Irisawa & Okada, 2009)
<i>L. fabifermentans</i>	(De Bruyne, et al., 2009)	<i>L. sunkii</i>	(Watanabe, et al., 2009)
<i>L. farraginis</i>	(Endo & Okada, 2007b)	<i>L. taiwanensis</i>	(Wang, et al., 2009)
<i>L. ghanensis</i>	(Nielsen, et al., 2007)	<i>L. thailandensis</i>	(Tanasupawat, et al., 2007)
<i>L. hayakitensis</i>	(Morita, et al., 2007)	<i>L. uvarum</i>	(Mañes-Lázaro, et al., 2008b)
<i>L. hordei</i>	(Rouse, et al., 2008)		

Al margen del gran interés despertado en las cepas de este género, estas bacterias constituyen menos del 1% del total de la comunidad microbiana

en las heces humanas. Muchos de los lactobacilos detectados en las heces humanas se emplean en la preparación de alimentos fermentados y parece que se trata de cepas alóctonas. Posiblemente un número relativamente pequeño de lactobacilos sean autóctonos del tracto digestivo humano (Tannock, 2002). A pesar de estos hechos, este género es sin duda el más empleado como probiótico, posiblemente por sus ventajas en cuanto a manipulación frente a las bifidobacterias.

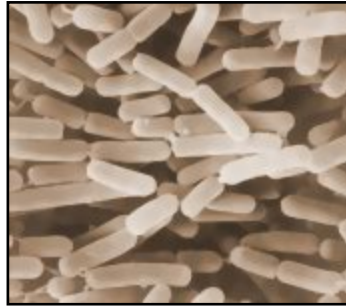


Fig.1 Imagen al microscopio de *L.acidophilus*

1.1.3.2 Género *Bifidobacterium*

Desde que fue aislada por primera vez por Tissier (1900), la taxonomía de este género microbiano ha cambiado constantemente. Inicialmente las bifidobacterias fueron asignadas a los géneros *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* antes de ser reconocidas como un género diferente en 1974 (Vasiljevic & Shah, 2008). Debido a su alto contenido en G+C (55-57 mol%), las bifidobacterias se asignaron filogenéticamente a la división de los actinomicetos dentro de las bacterias Gram positivas, de manera que actualmente pertenecen a la familia *Bifidobacteriaceae* dentro del phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, clase que también incluye a los géneros *Atopobium*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium* y a las micobacterias. A pesar de estar algo diferenciadas filogenéticamente del grupo tradicional de las bacterias del ácido láctico, este género se considera de aplicación probiótica por su uso en alimentos y su efecto beneficioso sobre el tracto gastrointestinal humano (Ramos-Cormenzana, *et al.*, 2005; Stiles & Holzapfel, 1997).

Las bifidobacterias son bacilos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios estrictos (algunas cepas pueden tolerar O₂ en presencia de CO₂), no formadores de esporas y no móviles. Son bacilos pleomórficos, de manera

que pueden variar su morfología desde bacilos a formas ramificadas en “Y” o “V”, ensanchadas normalmente en uno de sus extremos (Figura 2). Esta ramificación depende, no solo de la especie, sino también del medio de cultivo en el que se haya crecido la bacteria. Aunque esta morfología puede ser muy característica y útil para su identificación, ya que se pueden detectar diferencias morfológicas incluso entre especies, es necesario emplear pruebas bioquímicas y de biología molecular, que incluyen técnicas de hibridación DNA-DNA para diferenciar las distintas especies dentro de las bifidobacterias así como las bifidobacterias de géneros cercanos filogenéticamente, tales como *Actinomyces* y *Propionibacterium*. Las bifidobacterias fermentan las hexosas produciendo ácido láctico y ácido acético en proporción 2:3 mediante la enzima fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa, la cual es una enzima clave para su identificación fenotípica a nivel de género, ya que son las únicas bacterias intestinales que se conocen que son capaces de utilizar esta ruta metabólica (Ramos-Cormenzana, *et al.*, 2005; Stiles & Holzapfel, 1997; Vasiljevic & Shah, 2008).

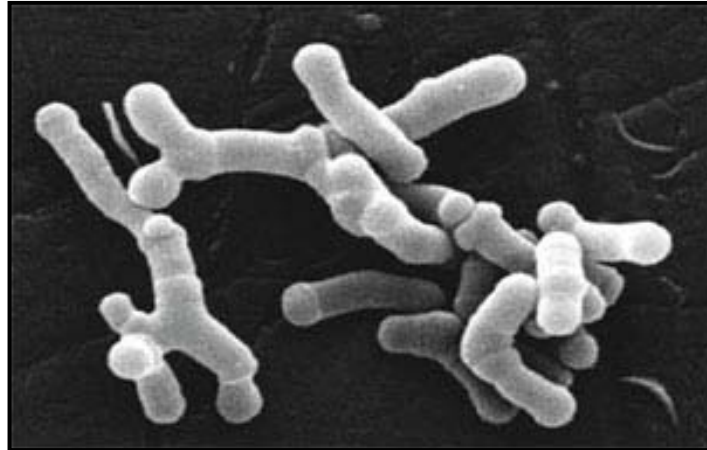


Fig.2 Imagen al microscopio de *B.longum*

Debido a que son nutricionalmente de naturaleza exigente, con frecuencia resulta complicado su aislamiento y crecimiento en laboratorio. En la actualidad, se han descrito 33 especies dentro de este género (Tabla 8), de las cuales exhiben propiedades probióticas algunas cepas de las especies *B.adolescentis*, *B.animalis*, *B.breve*, *B.logum* subsp. *infantis* y *B.longum* subsp. *longum* (Felis & Dellaglio, 2007). En el presente trabajo de tesis se ha empleado la cepa *B.longum* subsp.*longum*.

Tabla 8. Especies de *Bifidobacterium*.

<i>B.adolescentis</i>*	<i>B.longum</i> subsp. <i>infantis</i>*
<i>B.angulatum</i>*	<i>B.longum</i> subsp. <i>suis</i>
<i>B.animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	<i>B.magnum</i>
<i>B.animalis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>B.merycicum</i>
<i>B.asteroides</i>	<i>B.minimum</i>
<i>B.bifidum</i>*	<i>B.mongoliense</i>
<i>B.bombi</i>	<i>B.pseudocatenulatum</i>*
<i>B.boum</i>	<i>B.pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>
<i>B.breve</i>	<i>B.pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>*
<i>B.catenulatum</i>*	<i>B.psychraerophilum</i>
<i>B.choerinum</i>	<i>B.pullorum</i>
<i>B.coryneforme</i>	<i>B.rumiantium</i>
<i>B.crudilactis</i>	<i>B.saeculare</i>
<i>B.cuniculi</i>	<i>B.scardovii</i>
<i>B.dentium</i>*	<i>B.subtile</i>
<i>B.gallicum</i>*	<i>B.thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>
<i>B.gallinarum</i>	<i>B.thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>
<i>B.indicum</i>	<i>B.thermophilum</i>
<i>B.longum</i> subsp. <i>longum</i>*	<i>B.tsurumiense</i>

*En negrita cepas detectadas en heces humanas

Las bifidobacterias representan menos del 10% de la microbiota fecal cultivable en adultos cuando se emplean métodos clásicos de cultivo y un 1-3% si se aplican técnicas moleculares. Sin embargo, este grupo microbiano resulta predominante en la microbiota intestinal de recién nacidos, especialmente en aquellos alimentados con leche materna, presencia que ha sido asociada a una menor incidencia de trastornos intestinales en bebés (Tannock, 2002). Su aplicación en productos alimentarios, especialmente lácteos fermentados, es ampliamente estudiada principalmente empleando aquellas cepas de procedencia humana (Abe, *et al.*, 2009; Andrade & Borges, 2009; Guyonnet, *et al.*, 2009). Igualmente en la actualidad existen preparados alimentarios comerciales que contienen estos microorganismos, como por ejemplo el yogur “Activia” de Danone (Francia), que contiene *B. animalis* DN-173 010 Regularis™ como microorganismo probiótico (Saulnier, *et al.*, 2009).

1.1.4 Efectos beneficiosos de microorganismos probióticos

A lo largo de los años, desde los descubrimientos de Metchnikoff, se ha atribuido a los microorganismos probióticos propiedades beneficiosas sobre el ser humano, ejerciendo sus efectos a diversos niveles, por ejemplo, sobre el tracto gastrointestinal, el sistema inmune, el sistema cardiovascular o el tracto urogenital. Mientras que algunos de estos beneficios han sido bien documentados y ensayados en humanos controlados a doble ciego, con grupos divididos de manera aleatoria y con sus correspondientes grupos placebo, otros han evidenciado su efecto y su gran potencial en modelos animales, pero aún necesitan ser comprobados mediante estudios en humanos. Por otro lado, es muy importante destacar que estos efectos beneficiosos dependen de la cepa empleada, por lo tanto, no existe una cepa universal que proporcione todos los efectos probióticos beneficiosos, hasta incluso distintas cepas dentro de la misma especie pueden presentar variaciones en los efectos sobre el hospedador (Vasiljevic & Shah, 2008).

1.1.4.1 Tracto gastrointestinal

Los probióticos son microorganismos con una serie de propiedades que los hace interesantes para su aplicación en el sistema gastrointestinal. Son capaces de sobrevivir el paso a través de este tracto, es decir, son capaces de resistir el pH ácido del estómago, los enzimas pancreáticos y las sales biliares. Debido a su capacidad de adhesión al epitelio intestinal, pueden paliar daños producidos en las paredes intestinales así como también facilitar la exclusión de patógenos.

Los mecanismos de acción de los microorganismos probióticos dirigidos al control de patógenos intestinales incluyen: estimulación del sistema inmune; competición por los receptores o sitios de adhesión y los nutrientes y factores de crecimiento; cambios en el pH del medio debido a la producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias probióticas; secreción de componentes antimicrobianos como las bacteriocinas (Fooks & Gibson, 2002; Ramos-Cormenzana, *et al.*, 2005).

Las aplicaciones de mayor interés incluyen su uso en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) o en el cáncer, dada la rápida evolución que estas enfermedades presentan en la sociedad actual.

A- Intolerancia a la lactosa

El término “intolerancia a la lactosa” hace referencia a la incapacidad de digerir cantidades significativas de lactosa. Alrededor del 70% de la población son malabsorbedores de la lactosa. Durante la digestión, la lactosa es hidrolizada por la enzima lactasa (β -galactosidasa) en el borde de cepillo de la membrana de la mucosa del intestino delgado, descomponiéndola en glucosa y galactosa, las cuales se absorben y pasan a la sangre. Aquellos individuos que poseen intolerancia a la lactosa sufren de hipolactasia, es decir, la enzima lactasa presenta una actividad un 10% inferior a la que tiene durante la infancia, y esta hipolactasia va a estar por tanto asociada a una maldigestión de la lactosa. Tanto la hipolactasia como la malabsorción de lactosa van acompañados de síntomas clínicos que son designados como intolerancia a la lactosa. Estos síntomas son hinchazón, flatulencia, náuseas, dolor abdominal y diarrea, causados porque la lactosa no digerida es fermentada por bacterias intestinales, produciendo un incremento de la presión osmótica en el lumen que produce un aumento del flujo de entrada de agua. Estos síntomas aparecen entre 30 min y 2 horas tras la ingestión de alimentos con contenido en lactosa (Saulnier, *et al.*, 2009; Vasiljevic & Shah, 2008).

Según estudios realizados por diferentes investigadores, pareciera ser que los microorganismos iniciadores del yogur (*Streptococcus thermophilus* y *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) son suficientes para mejorar la digestión de la lactosa y aliviar los síntomas (Hertzler & Clancy, 2003; Montalto, *et al.*, 2005). Esta mejoría podría deberse, por una parte, a que estos microorganismos van a utilizar la lactosa como fuente de energía durante su crecimiento reduciendo el contenido en lactosa de los productos lácteos fermentados y, por otro, porque a su paso por el tracto digestivo estos microorganismos podrán lisarse porque no son resistentes a las sales biliares y liberarían la lactasa bacteriana al lumen intestinal, ayudando con ello a la digestión de la lactosa.

B- Diarrea

Entre los efectos más documentados de los probióticos se encuentra la prevención y tratamiento de la diarrea de diversas etiologías, entre las que se incluyen: la diarrea infecciosa, asociada a tratamiento antibiótico o “del viajero”.

La infección por Rotavirus es una causa muy común de diarrea infantil. Se ha demostrado mediante numerosos estudios clínicos que diferentes probióticos, incluyendo *L. acidophilus*, *L.rhamnosus* GG y *L. reuteri*, son efectivos tanto en el tratamiento como en la prevención de este tipo de diarrea (Lemberg, *et al.*, 2007; Sazawal, *et al.*, 2006).

La diarrea asociada a antibióticos es una inflamación aguda de la mucosa intestinal causada por la administración de antibióticos de amplio espectro. El agente etiológico más comúnmente asociado a este tipo de diarrea es *Clostridium difficile*, organismo indígena de la microbiota intestinal que normalmente se encuentra en ella en número reducido; sin embargo, tras un tratamiento antibiótico que afecte el equilibrio normal de la microbiota, puede aumentar su concentración y la concomitante producción de toxina, lo que causa diarrea. Según un meta-análisis realizado con 34 estudios aleatorios, de doble-ciego y controlados con placebo, la administración de probióticos redujo este tipo de diarrea en un 52%, efecto beneficioso que también se demostró en la diarrea “del viajero”, en donde el riesgo de padecerla se redujo en un 8%. Además, todas las cepas evaluadas, en donde estaban incluidas *S.bouardii*, *L.rhamnosus* GG, *L.acidophilus* y *L. bulgaricus*, tanto en combinación como por separado, mostraron un efecto similar (Sazawal, *et al.*, 2006).

C- Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)

La enfermedad inflamatoria intestinal es una afección crónica que causa inflamación en el tubo o las paredes del tracto gastrointestinal. Ésta puede provocar úlceras que sangran, dolor abdominal y diarrea, entre otros síntomas. Los tipos más comunes de IBD son la colitis ulcerosa o UC (“ulcerative colitis”), en que la inflamación está localizada en las capas superiores de la pared del intestino grueso o colon, y la enfermedad de Crohn o CD (“Crohn’s disease”), cuya inflamación es más profunda, pudiendo producirse en cualquier sección

del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano. Aunque ambas producen inflamación, la UC es una respuesta inmune tipo Th-2 con una producción predominante de citoquinas inflamatorias, mientras que la CD es predominantemente una respuesta Th-1. Ambas enfermedades son crónicas, presentan períodos de remisión y recaídas y su etiología aún es desconocida (Fuentes, 2005; Vasiljevic & Shah, 2008).

La microbiota intestinal juega un papel importante en los periodos inflamatorios de la enfermedad, en cuyo caso un tratamiento probiótico podría remediar la inflamación a través de su interacción con la microbiota autóctona. Se han realizado numerosos estudios en este campo, sin embargo existe la necesidad de realizar estudios con un número mayor de sujetos, aleatorios, de doble-ciego y controlados con placebo para establecer la eficiencia real de las cepas probióticas testadas y sus combinaciones. La evidencia más significativa de que el uso de probióticos puede ayudar en esta enfermedad proviene de ensayos clínicos aleatorios, de doble ciego y controlados con placebo, realizados con la mezcla probiótica VSL#3, compuesta por cuatro cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*), 3 de *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*) y una de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. La administración de esta mezcla a pacientes con “pouchitis” disminuyó el número de recaídas, mejorando la calidad de vida de los pacientes (Gionchetti, *et al.*, 2000; Gionchetti, *et al.*, 2003; Mimura, *et al.*, 2004).

D- Gastritis asociada a *Helicobacter pylori*

Estudios *in vitro* y ensayos en modelos de experimentación revelan la capacidad que poseen las bacterias del ácido láctico de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, patógeno Gram negativo responsable de la gastritis crónica, úlcera péptica que incrementa el riesgo de padecer cáncer gástrico. Además son capaces de inhibir la actividad ureasa de esta bacteria, necesaria para su supervivencia en el pH gástrico (Midolo, *et al.*, 1995). En estudios *in vivo* en animales y humanos, los microorganismos probióticos no son capaces de erradicar a este microorganismo, pero sí son capaces de reducir la carga microbiana y la inflamación (Sgouras, *et al.*, 2005). De hecho, tras una

intervención con *L.casei* Shirota en pacientes infectados con *H.pylori* durante 6 semanas la actividad ureolítica se redujo en un 64%, mientras que el grupo placebo sólo redujo esta actividad en un 33% (Cats, *et al.*, 2003). De manera similar, la ingesta regular de yogur conteniendo *B.animalis* Bb12 y *L.acidophilus* La5 suprimió la infección por *H.pylori* en humanos (Wang, *et al.*, 2004).

E- Cáncer

Las bacterias intestinales y algunos productos metabólicos de carácter genotóxico (nitrosaminas, aminas heterocíclicas, componentes fenólicos y amonio) han sido identificados, entre otros, como responsables de la inducción del cáncer colorectal. Por otra parte, estudios epidemiológicos han mostrado que la dieta juega un papel importante en la etiología de la mayoría de cánceres localizados en el intestino grueso, lo que lleva a pensar que se podrían prevenir con algún tipo de producto probiótico (Ramos-Cormenzana, 2008). La mayoría de los estudios confirman la implicación de la microbiota endógena en la aparición del cáncer de colon. Es por ello que algunos estudios epidemiológicos han enfatizado el hecho de que la administración de microorganismos probióticos podría reducir la incidencia de cáncer de colon (Hirayama & Rafter, 2000) mientras que estudios experimentales han mostrado la capacidad de ciertas cepas de lactobacilos y bifidobacterias para disminuir la actividad genotóxica de algunos productos químicos (Tavan, *et al.*, 2002) y para aumentar la actividad antimutagénica durante el crecimiento en medios selectivos (Lo, *et al.*, 2004).

1.1.4.2 Sistema Inmune y Alergias

El sistema inmune humano está formado por una compleja red de reacciones conectadas entre sí y perfectamente organizadas. Consta de 2 “líneas de defensa”, una inmunidad innata (natural o inespecífica), que permite controlar la mayor parte de los agentes patógenos, y una inmunidad adquirida (adaptativa o específica), que suministra una respuesta específica frente a cada agente infeccioso. El sistema inmune innato está representado a nivel celular por los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y las células “natural killer”

(NK), mientras que el sistema de inmunidad adquirida, está mediado por los linfocitos B, en la respuesta humoral, y por los linfocitos T, en la celular (Ramos Cormenzana, 2009).

Estudios realizados en individuos sanos muestran un incremento en la respuesta inmune inespecífica como consecuencia de la administración de diferentes cepas probióticas, que se refleja en un incremento de la actividad de las células NK y de los neutrófilos PMN y/o de la actividad fagocítica de los macrófagos tras la administración de las cepas *L.casei* DN 114001 (Parra, *et al.*, 2004), *L.rhamnosus* HN001 (Sheih, *et al.*, 2001) o *B.lactis* HN019 (Chiang, *et al.*, 2000; Gill, *et al.*, 2001).

Una revisión reciente sobre el efecto que los microorganismos probióticos pueden ejercer sobre el sistema inmune concluye que existen evidencias experimentales, en modelos *in vitro* e *in vivo* en animales, de las capacidades inmunomoduladoras de los microorganismos probióticos, siempre teniendo en cuenta que estos efectos dependen de la cepa empleada. Sin embargo, a pesar de obtenerse resultados esperanzadores en el tratamiento de IBD y en la prevención y tratamiento de eczema atópico en neonatos y niños, los ensayos clínicos realizados en humanos evidencian resultados contradictorios, posiblemente por problemas en la dosificación o por la microbiota endógena de cada individuo, la cual va a interactuar con las cepas probióticas administradas (Borchers, *et al.*, 2009).

Cuando se trata del tema de alergia, se hace referencia a una respuesta anormal del sistema inmune al entrar en contacto con una sustancia extraña, denominada *alérgeno*. El acto o proceso de inducir una sensibilidad adquirida se llama *sensibilización* y es el paso previo a la alergia, la cual aparece tras una segunda exposición al alérgeno. La aparición de procesos alérgicos ha ido incrementándose hasta nuestros días, observándose claras diferencias entre los países desarrollados y en desarrollo, pudiendo esto estar provocado por la conocida como “hipótesis de la higiene”, según la cual una excesiva higiene y cuidado de los niños, así como el abuso de antibióticos, podrían ser la causa de alergias, al evitar el contacto en edades tempranas con distintos antígenos o microorganismos, impidiendo así la creación de defensas por el sistema inmune frente a ellos (Strachan, 1989). De acuerdo con este principio, parece existir un impacto de la microbiota intestinal en el riesgo de desarrollar alergias,

habiéndose detectado menores números de bifidobacterias y cambios cualitativos en la composición de ésta microbiota en niños alérgicos cuando se comparan con niños sanos (Okada, *et al.*, 2010; Weichselbaum, 2009).

Revisiones recientes del efecto que la administración de probióticos puede ejercer en el tratamiento y prevención de alergias, muestran resultados positivos en la prevención y tratamiento de procesos alérgicos (Vasiljevic & Shah, 2008; Weichselbaum, 2009). Se ha demostrado en un estudio que la administración de *L.rhamnosus* GG y *B.lactis* Bb-12 a mujeres embarazadas desde el primer trimestre de embarazo hasta el final de la lactancia tuvo un efecto protector frente a la sensibilización (lo redujo a la mitad) en los niños de alto riesgo, es decir, aquéllos cuya madre presentaba algún tipo de alergia previamente (Huurre, *et al.*, 2008). En cuanto a estudios realizados en adultos, parece ser que la administración de probióticos reduce los síntomas de rinitis alérgica ocasionada por el polen de cedro japonés en adultos, aunque no se ha demostrado su eficacia en el tratamiento y prevención de ésta reacción alérgica (Xiao, *et al.*, 2006a; Xiao, *et al.*, 2006b; Xiao, *et al.*, 2007).

1.1.4.3 Sistema Cardiovascular: Hipercolesterolemia

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo cardiovascular, causa de muerte en muchos países. Se ha visto que una reducción de un 1% en los niveles de colesterol plasmático puede disminuir el riesgo de enfermedades coronarias hasta un 3%. Pareciera ser que uno de los mecanismos por el cual las bacterias probióticas ejercen algún efecto sobre este sistema es por la desconjugación de las sales biliares a cargo de cepas capaces de producir la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH). Las sales biliares desconjugadas se excretan más fácilmente a través de las heces que en su forma conjugada, de manera que las cepas bacterianas con actividad BSH pueden reducir el colesterol sérico, por un lado incrementando la excreción de sales biliares, con el consecuente incremento en la síntesis de sales biliares a partir de colesterol sérico; o disminuyendo la solubilidad del colesterol, y por lo tanto reduciendo su absorción a nivel intestinal (Nguyen, *et al.*, 2007; Vasiljevic & Shah, 2008).

El estudio más destacado que se realizó para establecer la capacidad de hidrolizar sales biliares de numerosas cepas de LAB indicó que la actividad BSH era común en cepas de los género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, pero está ausente en *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus thermophilus*. Casi todas las cepas y especies de bifidobacterias presentaban actividad BSH, mientras que ésta sólo fue detectada en algunas especies de lactobacilos (Tanaka, *et al.*, 1999). En otro estudio realizado *in vivo* en ratones a los que se administró la cepa *L.plantarum* PH04, se observó una reducción de los niveles de colesterol sérico así como también de los niveles de triglicéridos a consecuencia de esta administración (Nguyen, *et al.*, 2007). Otro estudio más reciente realizado con otra cepa de *L. plantarum* (*L. plantarum* KCTC3928) evidenció resultados positivos en la reducción del colesterol sanguíneo, de tal manera que la de administración de esta cepa redujo los niveles de LDL y de triglicéridos séricos en un 42% y un 32%, así como también aceleró la excreción de ácido biliares a través de las heces (Jeun, *et al.*, 2010).

1.1.4.4 Tracto Urogenital

Dentro de este apartado se engloban enfermedades infecciosas vaginales y del tracto urinario, así como también las vaginitis provocadas por bacterias y levaduras, especialmente *Candida albicans*. Con frecuencia estas infecciones se caracterizan por una alteración en la microbiota local que puede estar asociada a deficiencias hormonales, actividad sexual o a medidas anticonceptivas, junto a otros factores. Esta alteración estaría caracterizada por una pérdida de predominancia de los lactobacilos en la microbiota vaginal en favor de coliformes uropatogénicos (Barrons & Tassone, 2008).

La capacidad de los lactobacilos para colonizar la mucosa vaginal depende de su capacidad de adhesión a las células del epitelio vaginal y de la vía de administración, vaginal u oral, vía esta última en la cual el microorganismo debe poder llegar al área rectal para ascender y colonizar la vagina. Propiedades antibacterianas de los lactobacilos útiles en la prevención y tratamiento de infecciones genitourinarias, como son producción de ácidos,

de peróxido de hidrógeno, de bacteriocinas y de biosurfactantes, así como también la capacidad de co-agregar con patógenos, son específicas de cada cepa, pero su contribución individual a la eficacia clínica aún es desconocida (Barrons & Tassone, 2008).

La combinación de las cepas *L.rhamnosus* GR-1 y *L.fermentum* RC-14 ha demostrado su eficacia colonizando el epitelio vaginal en estudio en humanos. Formulaciones orales de estas cepas normalizaron la población de lactobacilos vaginales tras 28-60 días del inicio del tratamiento (Reid & Burton, 2002; Reid, *et al.*, 2003). En el caso de su uso en formulaciones vaginales, la colonización local fue detectada al tercer día de administración, manteniéndose durante 12 días (Gardiner, *et al.*, 2002; Reid, *et al.*, 2001). Con ello, su administración se ha demostrado eficaz reduciendo la colonización vaginal de bacterias patógenas y levaduras, posibles causas de infección (Reid & Bruce, 2003).

1.1.5 Probióticos en las distintas etapas de la vida

En el apartado 2.1.4 se han detallado los efectos beneficiosos que los microorganismos probióticos pueden ejercer en la salud humana. Sin embargo, algunos efectos van pueden ejercer una mayor o menor incidencia dependiendo de la etapa de la vida en que el ser humano se encuentre. Existen varias etapas en la vida del ser humano que cursan con inmunodeficiencia fisiológica, fundamentalmente en la lactancia y en períodos avanzados de la vida, cuando los múltiples mecanismos que están involucrados van desde la involución tímica, hasta los procesos biomoleculares propios de la edad, que muchas veces van acompañados de malnutrición proteico-calórica (ingestión reducida de alimentos o aumento de los requerimientos de ellos), los cuales pueden provocar la aparición de procesos tumorales, infecciones y enfermedades autoinmunes; además, todos ellos están relacionados con la acción conjunta de los sistemas nervioso, endocrino y metabólico (Monteoliva-Sánchez, *et al.*, En prensa).

La acción de los probióticos sobre el hospedador humano en la etapa adulta está menos estudiada que en la niñez y edad anciana. En la primera

etapa de la vida es en la que se establecen los patrones de colonización microbiana del individuo y permanecerán estables a lo largo de su vida. La importancia en la ancianidad está marcada por las alteraciones propias de la inmunosenescencia, que ejerce un claro efecto o causa sobre la colonización microbiana intestinal alterándola.

Los estudios realizados en recién nacidos se han centrado principalmente en la idea de controlar el proceso de la colonización intestinal. Los estudios de la microbiota intestinal neonatal y las diferencias en los patrones de colonización han influenciado las prácticas de alimentación y de forma reciente se han desarrollado fórmulas infantiles que contienen tanto prebióticos como microorganismos probióticos. Por otro lado, la utilización de probióticos en niños y adolescentes se ha centrado principalmente en la prevención y tratamiento con éxito de diarreas y alergias (Monteoliva-Sánchez, *et al.*, En prensa). Algunos de los resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos en pediatría se muestran en la tabla 9:

Tabla 9. Resultados y beneficios clínicos más frecuentes obtenidos con la administración de probióticos en pediatría

Área de estudio	Beneficios clínicos
Tratamiento de la diarrea	Disminución en la frecuencia Disminución en la duración Reducción del tiempo de hospitalización y de la severidad de los síntomas durante la misma
Prevención de la diarrea	Reducción en la incidencia Reducción de la severidad de los síntomas
Diarrea asociada al tratamiento antibiótico	Reducción de la incidencia y/o severidad de los síntomas
Enterocolitis necrotizante	Reducción de la incidencia y severidad de los síntomas
Prevención de la dermatitis atópica	Reducción de la incidencia
Tratamiento de la dermatitis atópica	Reducción de la severidad de los síntomas

Adaptada de Saavedra (2007)

En la edad adulta la intervención con microorganismos probióticos se ha centrado en el mantenimiento del estado de salud del hospedador, obteniéndose resultados positivos tanto en individuos sanos como con estrés. Se han empleado favorablemente en el tratamiento de infecciones urogenitales en mujeres y en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, así como también ha sido propuesto su uso para el tratamiento de la obesidad con el fin de normalizar la microbiota intestinal y aprovechar sus características en el sentido de que son capaces de modificar el metabolismo de los ácidos grasos, incrementar la recirculación enterohepática de las sales biliares y de las grasas de la dieta, estimular la glucólisis y modular el metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (Tennyson & Friedman, 2008).

Durante el envejecimiento se produce un descenso de determinadas funciones fisiológicas. El riesgo al que están sometidos los individuos de sufrir enfermedades en la etapa anciana es mucho mayor debido a lo que se denomina *inmunosenescencia*, que se caracteriza por una pérdida de linfocitos y un declive de su actividad. Por otro lado, se ha encontrado déficit nutricional en ancianos aparentemente sanos, pero que al realizarles los estudios de micronutrientes en los depósitos en los tejidos, éstos han sido escasos. En este sentido se le ha concedido una gran importancia a los probióticos en la recuperación de la malnutrición de estas personas ancianas, y se han obtenido buenos resultados clínicos, no solo en la recuperación nutricional sino en la del sistema inmunológico (Cano & Perdigon, 2003; Laiho, *et al.*, 2002; Matsuzaki & Chin, 2000). Además, tanto el efecto directo como indirecto de los probióticos sobre el sistema inmune son beneficiosos para la 3ª edad, ya que les proporciona una profilaxis ante posibles infecciones así como también un incremento de sus defensas durante el transcurso de una enfermedad, lo que puede ayudar a una mejor y más rápida recuperación. Finalmente, la intervención con probióticos ha mostrado una mejora en el alivio del estreñimiento propio de la vejez y, parece ser, un efecto protector frente al desarrollo de tumores en el colon.

1.1.6 Seguridad y estabilidad de los microorganismos probióticos: requisitos para su aplicación alimentaria.

La descripción de nuevas cepas probióticas para su aplicación en productos alimentarios requiere una evaluación completa de aquellas características que pueden afectar a su seguridad: propiedades intrínsecas de la cepa (propiedades enzimáticas y metabólicas, por ejemplo), farmacocinética (supervivencia, actividad en el intestino, relación dosis-respuesta, recogida en heces y en las mucosas) e interacciones entre la cepa y el hospedador. Mientras que las propiedades farmacocinéticas van a estar más relacionadas con la estabilidad de la cepa, las otras dos hacen referencia a la seguridad de la misma (Salminen, *et al.*, 1998).

Centrándonos en la necesaria seguridad de la cepa es importante afirmar que aunque son muchas las propiedades beneficiosas de los microorganismos probióticos, es requisito indispensable que su administración no suponga ningún riesgo para la salud del consumidor. En teoría, los probióticos pueden ser responsable de varios tipos de efectos adversos en individuos susceptibles: infecciones sistémicas, actividades metabólicas perjudiciales, excesiva estimulación inmune y transferencia genética. En la práctica, sin embargo, son extremadamente excepcionales los efectos adversos registrados en seres humanos por especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. De hecho, un gran número de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* tienen estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) y otras muchas han sido empleadas tradicionalmente en los alimentos y se les considera Microorganismos de Grado Alimentario (MGA), seguros por su ausencia de efectos adversos documentada a lo largo de la historia o por su presencia en la microbiota gastrointestinal humana endógena (Del Piano, *et al.*, 2006; Holzapfel, *et al.*, 1998).

Aunque en raras ocasiones se han publicado casos de bacteriemia asociada a microorganismos probióticos, éstas se han producido en pacientes inmunodeprimidos, hospitalizados o cateterizados, es decir, con un cuadro clínico previo que predispone a la adquisición de infecciones (Bernardeau, *et al.*, 2008; Salminen, *et al.*, 1998). Sin embargo, el criterio más estudiado la hora de seleccionar un microorganismo probiótico es la ausencia de resistencia

antibiótica adquirida y, por tanto, transmisible a otros microorganismos. Aunque la resistencia intrínseca a antibióticos es una propiedad deseable en cepas probióticas cuando se administran como coadyuvantes en tratamientos antibióticos de amplio espectro para restablecer la microbiota intestinal normal, la resistencia adquirida podría ser transmitida a otros microorganismos intestinales o patógenos haciendo muy complicado su posterior tratamiento a nivel clínico en caso de infección. De este modo, aquellas cepas que presenten plásmidos con resistencia antibiótica no deben ser usadas como probióticos animales o humanos (Del Piano, *et al.*, 2006; Salminen, *et al.*, 1998).

Por otro lado, y teniendo en cuenta que los microorganismos probióticos mayoritariamente se administran empleando productos alimentarios como vehículo, es necesario que la cepa probiótica sea estable en las matrices alimentarias para poder garantizar su eficacia y su capacidad para inducir en el hospedador sus efectos beneficiosos una vez que se encuentra en la formulación final. Para ello, los cultivos probióticos han de ser capaces de soportar las condiciones de procesamiento, retener sus propiedades probióticas tras el procesamiento y sobrevivir en cantidad suficiente en el producto durante su almacenamiento (Del Piano, *et al.*, 2006).

Muchos son los factores que pueden afectar la estabilidad y viabilidad de los probióticos, tales como acidificación del producto, producción de peróxido de hidrógeno, disponibilidad de nutrientes, presencia de oxígeno debido a la permeabilidad del envase, presión osmótica, temperatura de almacenamiento y posible interacción con otras especies microbianas, entre otros (Del Piano, *et al.*, 2006; Vasiljevic & Shah, 2008). Es por ello que las condiciones bajo las cuales los microorganismos probióticos, y por consiguiente los productos finales que los contienen, son procesados y almacenados deben estar muy bien definidas y controladas para limitar la variabilidad entre lotes y optimizar la viabilidad/eficacia de la cepa probiótica en el producto final.

1.2 Encapsulación de microorganismos probióticos

Para intentar proteger a los microorganismos probióticos de los factores que pueden afectar a su viabilidad en el producto final, así como también para ofrecerles protección frente a las condiciones adversas que encuentran a su

paso a través del tracto gastrointestinal superior, están cobrando cada día más atención las técnicas de encapsulación. El tamaño de los microorganismos probióticos (1-5 μm) elimina la posibilidad de emplear nanotecnologías en su encapsulación. Es por ello que de manera general se realiza la microencapsulación de probióticos.

Se define a la **microencapsulación** como “*la tecnología empleada para el embalaje/envoltura de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas cápsulas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo determinadas condiciones*” (Champagne & Fustier, 2007). Los términos *encapsulación* e *inmovilización* se han empleado indistintamente en los últimos años. Sin embargo, este uso no es totalmente correcto, ya que ambos conceptos se introdujeron para diferentes tecnologías. Mientras que la *encapsulación* es una tecnología en la cual se envuelve y cubre completamente a los probióticos con una matriz sin que exista exposición superficial de los probióticos al medio externo, la *inmovilización* se refiere a atrapar los microorganismo probióticos dentro o a través de una matriz, es decir, son cubiertos pero no necesariamente envueltos por la matriz, pudiendo existir en este caso exposición superficial de los mismos (de Vos, *et al.*, 2010; Kailasapathy, 2002).

Una microcápsula está constituida por una membrana fuerte, delgada, esférica y semipermeable que envuelve a un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que puede variar desde unas pocas micras a varios milímetros. Las perlas sin recubrimiento también se pueden considerar como microcápsulas en el sentido más amplio (Kailasapathy, 2002; Rokka & Rantamaki, 2010). La microencapsulación, por tanto, ayuda a separar el núcleo central, en nuestro caso los microorganismos probióticos, de su entorno hasta su liberación, protegiéndolo de diversos factores adversos como acidez, concentración de oxígeno y condiciones gástricas, mejorando con ello su estabilidad y vida media y proporcionando una liberación controlada dependiendo del material empleado como matriz. Esta liberación se puede producir mediante diversos mecanismos, como ruptura mecánica de la pared de la cápsula, disolución de la misma, fusión de la pared o difusión del contenido a través de la pared (Kailasapathy, 2002). Finalmente debe destacarse que, al tratarse la pared de las microcápsulas de una membrana semipermeable, permite el intercambio de

nutrientes y metabolitos con el exterior, hecho importante para el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos encapsulados.

1.2.1 Métodos de encapsulación

Existen una gran variedad de métodos de encapsulación aplicables en diversos campos (medicina, industria alimentaria, industria farmacéutica, agricultura, cosmética, etc.), sin embargo en este capítulo nos centraremos en aquellas metodologías empleadas con éxito en la microencapsulación de microorganismos probióticos.

Se debe señalar que como paso previo en todas las técnicas que se describen, se obtiene un cultivo de microorganismos probióticos crecidos en condiciones óptimas, los cuales son luego centrifugados y empleados en forma de suspensión o de polvo liofilizado para su posterior microencapsulación.

1.2.1.1 Metodología de emulsión

La **emulsificación** se define como un proceso de dispersión de un líquido en un segundo líquido inmiscible. Si se incluye el material a encapsular en el primer líquido, éste se puede encapsular aplicando esta metodología (de Vos, *et al.*, 2010). Como en la mayoría de los casos se emplean diversos polímeros como material de encapsulación, esta metodología aplicada a los microorganismos probióticos se desarrolla de la siguiente manera: un pequeño volumen de una solución polimérica con células microbianas en suspensión (fase discontinua) es añadido a un volumen mayor de aceite vegetal (fase continua), como aceite de soja, girasol o maíz y la mezcla es homogeneizada hasta formar una emulsión de agua en aceite. Una vez que la emulsión se ha formado, el polímero hidrosoluble ha de ser insolubilizado mediante “cross-linking” o entrecruzamiento para formar las cápsulas dentro de la fase oleosa (Figura 3) (Krasaekoopt, *et al.*, 2003). El método de insolubilización va a depender del tipo de polímero que se use, por ejemplo, si se emplea alginato se insolubilizará con una solución de cloruro cálcico (Sheu & Marshall, 1993) y si el polímero empleado es el κ -carragenano, se insolubilizará con cloruro

potásico (Adhikari, *et al.*, 2003). Para ayudar a la formación de las cápsulas se suelen adicionar surfactantes, como el Tween 80, que inducen la encapsulación mediante la formación de micelas, vesículas, bicapas y micelas invertidas alrededor del producto a encapsular. El tamaño de las cápsulas resultantes puede variar de 20 μm a 2 mm y su tamaño final puede resultar reducido mediante el empleo de surfactantes y reduciendo el tamaño de la fase interna o discontinua.

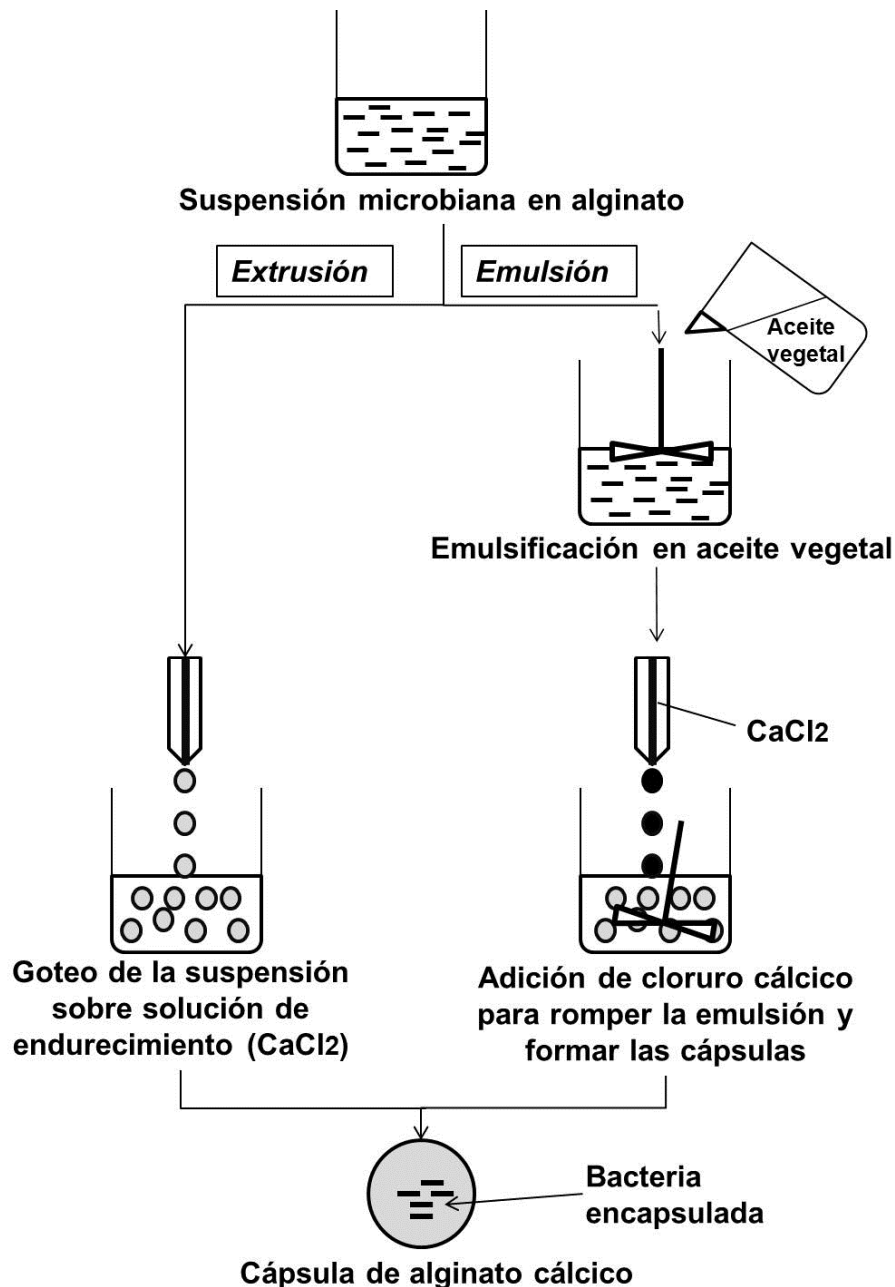


Fig. 3 Diagrama de flujo de la encapsulación de probióticos mediante las técnicas de emulsión y extrusión o goteo. Ejemplo realizado empleando alginato como matriz de encapsulación.

Aunque dicha técnica se ha empleado con éxito para la encapsulación de microorganismos probióticos (Adhikari, *et al.*, 2003; Cinquin, *et al.*, 2004; Ding & Shah, 2007, 2009a; Sheu & Marshall, 1993), presenta algunos inconvenientes a la hora de aplicarla en industria alimentaria: por un lado, el aceite residual en las cápsulas perjudica la textura y características organolépticas del alimento y, por otro, el aceite residual, los emulsificantes y surfactantes, pueden ser tóxicos para determinadas células (Kailasapathy, 2002). Además, la necesidad de añadir un paso más al proceso para eliminar estos residuos, junto con el empleo de aceites vegetales, encarecen este método de encapsulación.

1.2.1.2 Metodología de extrusión o goteo

La **extrusión** consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo (de Vos, *et al.*, 2010). Para ello, los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide y esta suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual, como en el método de emulsión, va a variar dependiendo del material empleado (Figura 3). El tamaño de las cápsulas obtenidas suele rondar los 2-4 mm, y éste va a depender del diámetro de salida de la solución, ya que cuanto menor sea el diámetro de la abertura correspondiente (aguja/boquilla), menor será el tamaño de las cápsulas. Se trata de una técnica apropiada para la encapsulación de microorganismos ya que es poco agresiva, no emplea disolventes perjudiciales para las bacterias, se puede llevar a cabo tanto en condiciones aerobias como anaerobias y, además, empleando los dispositivos adecuados se puede producir a gran escala. Es por ello que se trata de una técnica ampliamente aplicada en la encapsulación de probióticos (Chandramouli, *et al.*, 2004; Iyer & Kailasapathy, 2005; Iyer, *et al.*, 2005; Krasaekoopt, *et al.*, 2006; McMaster, *et al.*, 2005a; McMaster, *et al.*, 2005b; Sun & Griffiths, 2000).

Paralelamente al método de goteo simple y directo a través de una aguja, se han desarrollado otras técnicas más complejas como son el

generador electrostático de goteo, el “jet cutter” y las técnicas de rotura de un flujo laminar. Mientras el generador electrostático de goteo emplea un potencial electrostático entre la aguja y la solución de endurecimiento para reducir el tamaño de las cápsulas mediante la reducción de la tensión superficial de la superficie de la gota, en el “jet cutter” el fluido es extruido continuamente a través de una boquilla y el flujo formado va a ser roto en segmentos mediante una herramienta giratoria, de manera que, debido a la tensión superficial, estos segmentos van a formar cápsulas esféricas a medida que caen. La técnica de rotura de un flujo laminar se basa principalmente en la rotura de un fino chorro líquido en gotas del mismo tamaño, rotura que puede llevarse a cabo mediante la aplicación de una vibración determinada (Kailasapathy, 2002). Esta última técnica es comúnmente empleada en investigación (Inotech Encapsulator[®]) para la encapsulación de probióticos (Iyer & Kailasapathy, 2005; Iyer, *et al.*, 2005), mientras las dos primeras aún no se han utilizado con este fin.

1.2.1.3 Spray-drying o Desecación por Atomización

La **atomización**, como método de encapsulación, consiste en atomizar en aire caliente una suspensión o emulsión previamente homogeneizada de probióticos en la matriz del material elegido para encapsular, consiguiendo con ello una rápida evaporación del solvente (agua) para obtener finalmente los probióticos inmovilizados en forma de partículas de polvo (de Vos, *et al.*, 2010; Rokka & Rantamaki, 2010) (Figura 4). El proceso de atomización es controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura. En cuanto a los materiales empleados para la encapsulación, normalmente se emplean polisacáridos, aunque también es posible emplear proteínas, como la leche desnatada, como matriz (Rokka & Rantamaki, 2010).

Este proceso presenta una serie de ventajas, como son la posibilidad de establecer esta tecnología como un proceso continuo, su facilidad de manejo y su bajo coste, características que hacen de ésta una técnica idónea para su aplicación en procesos industriales. Por otro lado, existen también desventajas asociadas a esta técnica: se trata de una técnica de inmovilización, más que de encapsulación, de manera que algunas bacterias pueden pasar al producto

cuando la hidratación tiene lugar y pueden alterar las propiedades del mismo (de Vos, *et al.*, 2010); otro importante inconveniente son las altas temperaturas empleadas en el proceso para la evaporación del solvente, las cuales pueden afectar a la supervivencia de determinadas cepas probióticas (de Vos, *et al.*, 2010; Kailasapathy, 2002). En un estudio realizado por O'Riordan, *et al.* (2001), aunque la atomización se demostró como un método válido para la encapsulación de bifidobacterias con almidón modificado, también se observó que éstas eran muy sensibles a las altas temperaturas de entrada. De hecho, temperaturas por encima de los 60°C daban como resultado un secado deficiente y, con frecuencia, una acumulación de productos pegajosos en el ciclón; mientras que temperaturas de entrada mayores a 120°C estaban asociadas con altas temperaturas de salida (>60°C) y con una reducción significativa de la viabilidad de las bifidobacterias encapsuladas.

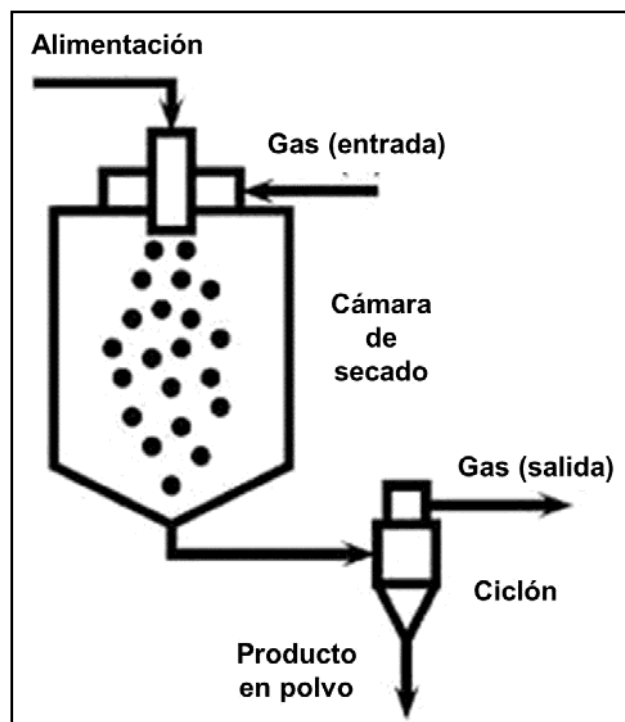


Fig.4 Esquema del proceso de atomización

1.2.1.4 Spray-cooling o Spray-chilling

Esta tecnología aplica el principio opuesto a la atomización. En ella una matriz fundida con bajo punto de fusión (32-42°C), conteniendo el producto a encapsular, es atomizada a través de una boquilla al interior de un recipiente.

Sin embargo, en este caso, se inyecta aire frío para solidificar la partícula de gel, permitiendo así la inmovilización. Aunque raramente se ha empleado en microorganismos probióticos, es una técnica de bajo coste y aplicable a industria, que elimina la desventaja de emplear altas temperaturas de la atomización, lo que la hace una técnica interesante para futuros estudios de encapsulación microbiana (Champagne & Fustier, 2007).

1.2.1.5 Liofilización

La **liofilización** es un proceso en el que se congela el producto y una vez congelado se introduce en una cámara de vacío para que se separe el agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido, obteniendo un producto seco. Esta metodología se ha propuesto como alternativa a la atomización cuando se manipulan bacterias termosensibles (Augustin & Hemar, 2009). Sin embargo, el secado, en general, no se considera una metodología realmente eficaz para la conservación de la actividad biológica de microorganismos (de Vos, *et al.*, 2010).

1.2.1.6 Spray-coating o Pulverización

En esta técnica, el material a encapsular es suspendido en aire y la matriz es pulverizada sobre el mismo, formando las cápsulas. El material de recubrimiento puede ser inyectado desde diversos ángulos (Figura 5), lo que influye en las propiedades del recubrimiento (Champagne & Fustier, 2007). Para su aplicación en probióticos, los microorganismos han de ser liofilizados como paso previo al recubrimiento, el cual se puede realizar con proteínas, carbohidratos, pero principalmente con materiales de base lipídica en industria alimentaria, lo que conlleva algunas limitaciones a la hora del recuento microbiano que han intentado ser solventadas en estudios realizados por Champagne, *et al.* (2010).

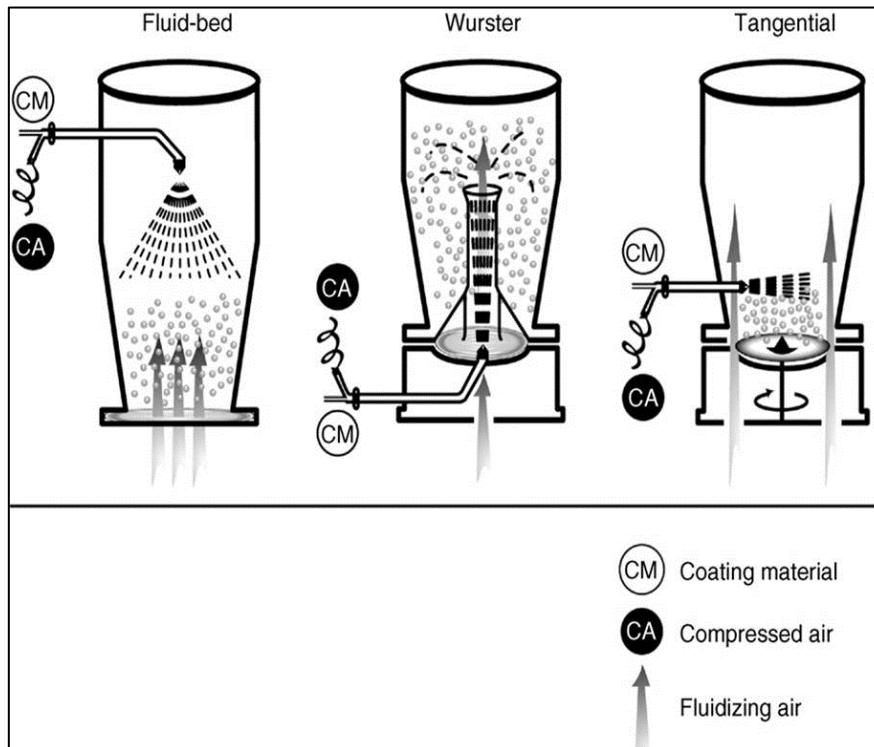


Fig. 5 Métodos de pulverización de probióticos (Champagne & Fustier, 2007).

1.2.1.7 Adhesión a almidón

El *almidón resistente*, es decir, aquel almidón que no es digerido por las amilasas pancreáticas en el intestino delgado y que puede ser fermentado por la microbiota del colon, puede emplearse como material de base para la encapsulación de probióticos. Esto es así porque ofrece una superficie ideal para que los probióticos se adhieran a los gránulos de almidón, proporcionándoles resistencia y protección frente a las condiciones adversas frente a los que pueden ser expuestos (Anal & Singh, 2007). En un estudio en el que se adhirieron LAB a gránulos de almidón de patata, tratados enzimáticamente para aumentar su porosidad y posteriormente sellados con amilosa, se encontró que las LAB así encapsuladas y posteriormente liofilizadas podían sobrevivir hasta 6 meses a temperatura ambiente y hasta 18 meses cuando se almacenaron a -20°C (Mattila-Sandholm, *et al.*, 2002).

1.2.1.8 Recubrimiento de microcápsulas con otros polímeros

En este caso no se trata de una técnica de encapsulación en sí misma, sino de una modificación de los resultados obtenidos con otras técnicas. El recubrimiento de las microcápsulas producidas mediante diferentes técnicas con una capa adicional permite prevenir la exposición de los microorganismos al oxígeno durante el almacenamiento así como mejorar su estabilidad a pH ácido. Posibles materiales de recubrimiento incluyen el quitosano, poli-L-lisina, alginato, almidón y gelatina (Rokka & Rantamaki, 2010). El recubrimiento más común es el de cápsulas de alginato con quitosano (Chavarri, *et al.*, 2010; Graff, *et al.*, 2008; Iyer, *et al.*, 2005; Krasaekoopt, *et al.*, 2006), ya que además de reportar una mayor protección frente a condiciones gástricas simuladas que el alginato o la poli-L-lisina (Krasaekoopt, *et al.*, 2004), proporciona una forma más esférica y no modifica el tamaño de las cápsulas (Rokka & Rantamaki, 2010).

1.2.2 Materiales de encapsulación

Como material de encapsulación de microorganismos probióticos normalmente se emplean **polisacáridos** de diferente origen: algas marinas (κ -carragenano, alginato), plantas (almidón y sus derivados, goma arábica), animales (quitosano) o bacterias (gelano, xantano); y **proteínas animales** (leche, gelatina). Mayoritariamente se emplean polisacáridos en la encapsulación de probióticos ya que constituyen una matriz cuya degradación se ve favorecida por microorganismos de la microbiota intestinal, lo que unido a la protección que ofrecen a nivel del tracto gastrointestinal superior, permite obtener una liberación de los microorganismos en el órgano diana (de Vos, *et al.*, 2010). A continuación realizaremos una breve descripción de algunos de los materiales más comúnmente empleados:

1.2.2.1 Alginato

Se trata de un polisacárido aniónico obtenido de algas marinas pardas. En cuanto a su composición química es un polímero lineal formado por residuos de los ácidos (1→4)-β-D-manurónico y α-L-gulurónico los cuales se encuentran formando bloques, tanto de cada uno de los ácidos como con una distribución aleatoria de los mismos (Figura 6). De este modo, se pueden obtener alginatos con diferente proporción de ambos ácidos, lo que permite obtener distintos grados de estabilidad mecánica (de Vos, *et al.*, 2010). El alginato es, probablemente, el polisacárido más utilizado en microencapsulación a nivel de laboratorio.

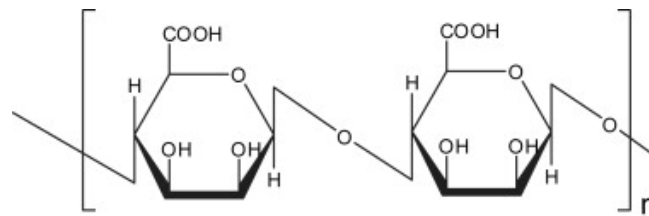


Fig.6 Estructura del alginato

1.2.2.2 K-Carragenano

El carragenano se obtiene de algunas algas de varias familias de *Rhodophyceae* (algas rojas). En cuanto a su composición química, el κ-carragenano está compuesto por unidades repetidas de D-galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro-D-galactosa unidas alternando enlaces α1→3 y β1→4 glicosídicos (Figura 7) (Rokka & Rantamaki, 2010). La gelificación es temperatura-dependiente pero para la formación de las cápsulas necesita de KCl, bien como solución de endurecimiento o para insolubilizar el polímero, dependiendo de la técnica empleada.

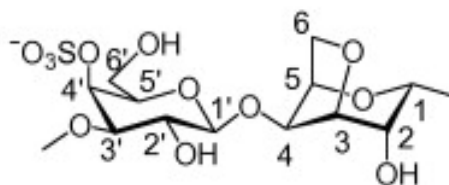


Fig.7 Estructura del κ-carragenano

1.2.2.3 Chitosan o Quitosano

El quitosano es una molécula policationica obtenida mediante desacetilación alcalina de la quitina presente en el exoesqueleto de los crustáceos. Su estructura química es la de un co-polímero de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Figura 8). Se disuelve fácilmente a pH ácido por lo que con frecuencia se emplea en combinación con otro polímero (frecuentemente alginato) que soporte el pH ácido del estómago. Una vez que alcanza el intestino delgado es degradado por la microbiota endógena.

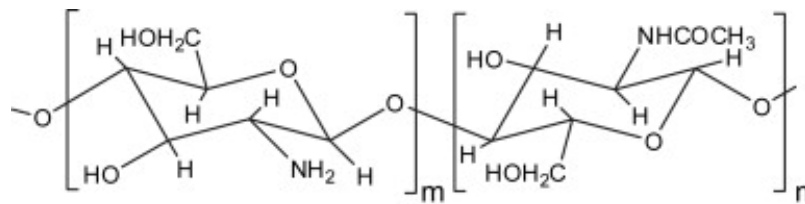


Fig.8 Estructura del quitosano

1.2.2.4 Almidón

La amilosa es el constituyente lineal del almidón, la cual está formada por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ (Figura 9). Estos enlaces son resistentes a la α -amilasa pancreática, pero pueden ser degradados por los enzimas producidos por la microbiota colónica. El almidón se puede hacer más resistente modificándolo mediante eterificación, esterificación o acidificación (de Vos, *et al.*, 2010). Además de emplearse en la inmovilización de probióticos, también puede funcionar como prebiótico en el intestino humano (Mattila-Sandholm, *et al.*, 2002).

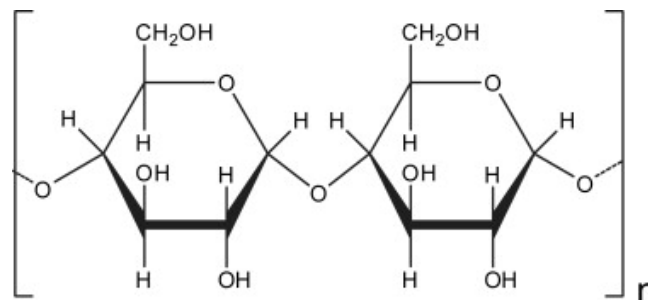


Fig.9 Estructura del almidón (amilosa)

1.2.2.5 Gelano

El gelano es un exopolisacárido microbiano aniónico obtenido de *Sphingomonas paucimobilis*. Se trata de un polisacárido lineal compuesto por la repetición de un tetrasacárido de D-glucosa, D- ácido glucurónico y L- ramnosa en una proporción molar de 2:1:1 en el cual las unidades están conectadas entre sí mediante enlaces $\alpha 1 \rightarrow 3$ (Figura 10) (Rokka & Rantamaki, 2010). Mientras que el gelano nativo contiene dos sustituyentes acilos en la misma molécula de glucosa, en los productos comerciales, los grupos acilos son eliminados completamente. El gelano, así como sus productos comerciales, es capaz de gelificar en presencia de iones mono y divalentes. Es muy empleado en industria alimentaria ya que esta propiedad lo hace capaz de actuar como agente gelificante y estructurante en alimentos.

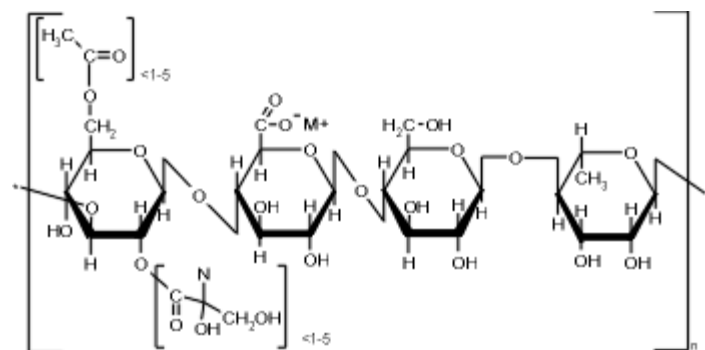


Fig.10 Estructura del gelano

1.2.2.6 Xantano

El xantano es un polisacárido extracelular obtenido del patógeno de plantas *Xanthomonas campestris*. Se trata de un polielectrolito aniónico, con un esqueleto consistente en una cadena lineal de $(1 \rightarrow 4)$ β -D-glucano celulosa, y cadenas laterales formadas por dos manosas y un ácido glucurónico (Figura 11). La molécula de xantano puede pasar de una conformación ordenada de doble hélice a una conformación de cola dispuesta al azar cuando se calienta entre 40 y 80°C, dependiendo de la fuerza iónica de la solución (Rodd, *et al.*, 2000). Debido a sus propiedades únicas, como son

solubilidad tanto en agua fría como en agua caliente, elevada viscosidad a pequeñas concentraciones, y estabilidad en sistemas ácidos, el xantano es usado como espesante, estabilizante y emulsionante en numerosas aplicaciones alimentarias (Bylaite, *et al.*, 2005). Combinado con gelano, es empleado en numerosos estudios de encapsulación (McMaster, *et al.*, 2005a; McMaster, *et al.*, 2005b; Sun & Griffiths, 2000).

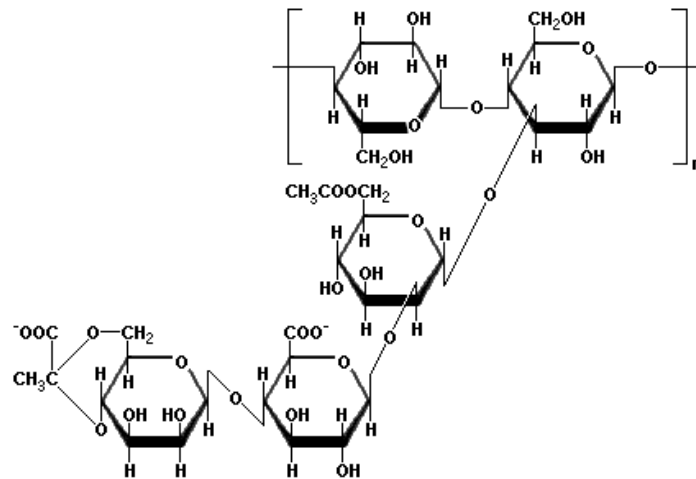


Fig.11 Estructura del xantano

1.3 Polímeros microbianos

Existen microorganismos capaces de sintetizar polisacáridos, los cuales pueden ser intracelulares, estructurales y/o extracelulares. Entre ellos, los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos han adquirido un especial interés debido a que muchos de ellos tienen importantes aplicaciones en el campo de la industria alimentaria y farmacéutica.

Podemos definir a los **exopolisacáridos o EPS** como “*polímeros de elevado peso molecular compuestos por residuos azucarados y que son secretados por microorganismos al medio que los rodea*” (Nicolaus, *et al.*, 2010). En general están constituidos por monosacáridos y algunos sustituyentes orgánicos e inorgánicos, como acetato, piruvato, succinato, sulfato y fosfato. Algunos de los exopolisacáridos y sus microorganismos productores se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Algunos EPS bacterianos de importancia comercial

Exopolisacárido	Microorganismo productor
Curdlano	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Gelano	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Desulfatoheparina	<i>Escherichia coli</i> K5
Ácido hialurónico	<i>Streptococcus equi</i> <i>Streptococcus zooepidemicus</i>
Succinoglucano	<i>Agrobacterium spp.</i> <i>Rhizobium spp.</i>
Xantano	<i>Xanthomonas campestris</i>

1.3.1 Clasificación de los exopolisacáridos microbianos

En general los EPS se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios:

1. *Grado de asociación a la membrana:*
 - a. Capsulares: el polisacárido está íntimamente asociado con la superficie celular unido mediante enlaces covalentes y forma una entidad morfológica denominada *cápsula*.
 - b. Libres: el polisacárido se encuentra débilmente unido a la superficie celular, formando una capa mucilaginosa libre.
2. *Estructura y composición:*
 - a. Homopolisacáridos: constituidos por un único tipo de unidades glucídicas
 - b. Heteropolisacáridos: constituidos por varios tipos de unidades glucídicas
3. *Microorganismo productor:*
 - a. Bacterias
 - b. Hongos
 - c. Levaduras
 - d. Arqueas
4. *Mecanismo de síntesis:*
 - a. Extracelular
 - b. Intracelular

1.3.2 Composición, estructura y propiedades físicas de los exopolisacáridos

Los polisacáridos extracelulares sintetizados por bacterias pueden variar ampliamente en su composición y, por tanto, presentar diferentes propiedades físicas asociadas a esta composición. En referencia a la base de carbohidratos, las moléculas glicídicas pueden estar unidas mediante distintos tipos de enlace, de manera que si los enlaces son $\beta 1 \rightarrow 4$ o $\beta 1 \rightarrow 3$ la molécula presentará una estructura más rígida, mientras que si los enlaces son $\alpha 1 \rightarrow 2$ o $\alpha 1 \rightarrow 6$, las estructuras resultantes son más flexibles (Nicolaus, *et al.*, 2010). Por otro lado, las cadenas laterales presentes en muchos polisacáridos lineales provocan cambios conformacionales en la molécula que llevan a un desorden en la misma y dan como resultado la solubilidad de la molécula en soluciones acuosas (Kumar, *et al.*, 2007).

En general, aunque algunos exopolisacáridos son neutros (principalmente homopolisacáridos), la mayoría son polianiónicos debido a la presencia de ácidos urónicos (D-glucurónico mayoritariamente pero también D-galacturónico y D-manurónico) o de radicales piruvato. La presencia de radicales fosfato o, raramente, sulfato, también contribuye al estado polianiónico (Nicolaus, *et al.*, 2010). Estos radicales cargados permiten la interacción de los EPS con iones, como metales pesados o iones calcio y magnesio, y macromoléculas (Kumar, *et al.*, 2007), propiedades importantes en campos tales como biorremediación ambiental e industria alimentaria.

Los sustituyentes acilo también juegan un papel importante en las propiedades físicas de los EPS. La presencia o ausencia de estos radicales con frecuencia influye en la transición en solución de una conformación de cola dispuesta al azar a una conformación ordenada de doble hélice (Sutherland, 1994). Por otro lado, los grupos acetilo generalmente impiden asociaciones sinérgicas, y su retirada de los polisacáridos permite que gelifiquen a menores concentraciones. Ejemplo de este hecho es el gelano, cuyas formas comerciales son las desaciladas, ya que favorece la formación de geles más fuertes y quebradizos al interactuar con varios cationes cuando se comparan con los geles formados con su forma nativa (Sutherland, 1998).

1.3.3 Funciones de los exopolisacáridos

La función que los EPS ejercen en sus bacterias productoras va a depender del nicho ecológico en el que se encuentren pero, en general, en la mayoría de los casos ejercen una **función protectora**. La capacidad de los microorganismos de recubrirse de una capa de EPS altamente hidratado les permite estar protegidos frente a la deshidratación y al ataque de protozoos. Dentro de esta función protectora, la presencia de esta capa de EPS protege a las células de la acción de antibióticos, así como también, los EPS aniónicos pueden unirse y afectar la penetración de iones metálicos, tóxicos o no. En determinados nichos ecológicos, esta capacidad de formar complejos con los metales pesados puede ser clave para la supervivencia del microorganismo (Kumar, *et al.*, 2007; Nicolaus, *et al.*, 2003).

Por otro lado, los EPS tienen un papel importante en la **adhesión** de bacterias a superficies sólidas formando biofilms, de hecho, la estabilidad mecánica de los biofilms está determinada por los EPS (Flemming & Wingender, 2001). Los polímeros mantienen a las bacterias unidas y las protegen frente a condiciones ambientales desfavorables, siendo la formación de biofilms un proceso esencial en la supervivencia de muchas poblaciones microbianas (van Hullebusch, *et al.*, 2003). Otro tipo de adhesión mediada por exopolisacáridos es la que se produce entre bacterias fijadoras de nitrógeno y las raíces de plantas leguminosas para formar una asociación simbiótica (Nicolaus, *et al.*, 2010).

Los EPS tienen un papel determinante en el caso de **bacterias patógenas**. Como apunte, muchos de los polisacáridos de aplicación industrial empleados, como el xantano, son producidos por microorganismos patógenos. En ellos, la presencia de los exopolisacáridos, eminentemente en forma capsular, va a contribuir a la patogenicidad y a proteger al patógeno ayudándolo a evadir la fagocitosis y esquivar el sistema inmune del hospedador, ya que los polisacáridos capsulares no activan el sistema inmune debido a que su estructura química puede imitar la de los componentes de la superficie celular del hospedador (Kumar, *et al.*, 2007).

1.3.4 Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos

Los exopolisacáridos microbianos tienen gran variedad de aplicaciones por sus propiedades físicas y químicas, algunas de ellas especialmente interesantes a nivel industrial. Además de las propiedades que presentan por sí mismos, los EPS son capaces de interactuar tanto con materiales de origen biológico como sintético y pueden mostrar sinergismo con otros polisacáridos, lo que amplía el campo de aplicaciones de los mismos. Alteraciones de las propiedades químicas de los polisacáridos originales también pueden dar productos de gran interés, un ejemplo son los productos derivados del dextrano conocidos como Sephadex[®] (Sutherland, 1998).

1.3.4.1 Industria alimentaria

Los exopolisacáridos presentan propiedades interesantes para la industria alimentaria, lo que unido a que son biodegradables y a su posibilidad de producción a partir de fuentes renovables, ha hecho que cada vez se les preste una mayor atención dentro de esta industria. De hecho, exopolisacáridos como el xantano y el gelano llevan muchos años empleándose en diversos productos alimentarios a nivel mundial (Figura 12).

Algunos de estos EPS se emplean como agentes texturizantes y emulsificantes. Un ejemplo es el xantano, que por su gran solubilidad en agua se añade a los alimentos para alterar las propiedades reológicas del agua presente en los mismos y se emplea como estabilizador de emulsiones y suspensiones en salsas, sopas, etc., así como para estabilizar la espuma en cervezas (Rosalam & England, 2006; Sutherland, 1998). Además, por presentar en los alimentos buenas propiedades que incluyen una rápida liberación del sabor, buena textura y compatibilidad con otros ingredientes como las proteínas, lípidos y polisacáridos, también se utiliza como texturizante.

Al margen de las propiedades arriba mencionadas, el xantano también es empleado por su capacidad para inhibir la formación de cristales durante la

congelación, lo que permite mantener en óptimas condiciones las características del producto alimentario a congelar (Sutherland, 1998).

Otra aplicación que presentan algunos polímeros extracelulares es la de gelificantes. El gelano se emplea como agente gelificante y estabilizante en un amplio rango de alimentos. Sus geles permiten una buena liberación de sabor y son estables en el amplio rango de pH de los productos alimentarios (Sutherland, 1998). Esas mismas propiedades gelificantes y su amplio uso en la industria alimentaria, lo han transformado en un vehículo idóneo en el creciente campo de la encapsulación, solo o en combinación con otros EPS. Otro polímero microbiano que presenta propiedades gelificantes es el curdlano. Sus suspensiones acuosas pueden ser térmicamente inducidas para producir geles que son incapaces de volver al estado líquido aunque se vuelvan a calentar (Nicolaus, *et al.*, 2010). En Japón está permitido su uso como aditivo alimentario y se le considera como un agente gelificante natural, de hecho se emplea para mejorar la textura de alimentos tales como el tofu, pastas de pescado y gominolas (Sutherland, 1998).



Fig.12 Algunos productos que llevan EPS como aditivos

1.3.4.2 Industria médico-farmacéutica

Existen polisacáridos con capacidad antitrombótica o anticoagulante. El curdlano, por ejemplo, cuando se encuentra sulfatado presenta actividad antitrombótica (Franz & Alban, 1995). Por otro lado, *Alteromonas infernus* es capaz de sintetizar un exopolisacárido similar a la heparina, de bajo peso molecular, que exhibe propiedades anticoagulantes (Collic Jouault, *et al.*,

2001). *Escherichia coli* serotipo K5 es capaz de sintetizar un polisacárido en forma de desulfatoheparina (Vann, *et al.*, 1981), polisacárido útil en investigación médica y en la determinación de la especificidad de heparinasas y enzimas relacionadas. Se han registrado también EPS con actividad antitumoral e inmunoestimuladora, como por ejemplo los producidos por una especie de *Vibrio* marina (Okutani, 1984) y el curdlano (Sutherland, I. W., 1998).

En otro orden, existen cepas de estreptococos (*Streptococcus equi* y *Streptococcus zooepidemicus*) capaces de sintetizar ácido hialurónico aparentemente con una estructura química idéntica al obtenido de material eucariótico. Es compatible con el sistema inmune humano, lo que permite su uso en cirugías oculares y de articulaciones; además, por su gran capacidad de retención de agua, puede ser empleado en preparaciones cosméticas (Sutherland, 1998).

Otra aplicación en este campo es la de la celulosa bacteriana producida, entre otros, por *Actobacter xylinum* en forma de exopolisacárido. Esta celulosa bacteriana puede actuar temporalmente como sustituto de la piel, en pacientes con quemaduras o úlceras crónicas en la piel, ya que parece que estimula la regeneración de la piel al tiempo que limita las infecciones (Jonas & Farah, 1998).

1.3.4.3 Biorremediación ambiental

La mayoría de los polímeros muestran capacidad de biorremediación mediante la unión y retención de metales pesados. Disoluciones de polímeros pueden extraer metales pesados por quelación, reducción, precipitación o intercambio iónico. Un exopolisacárido producido por un microorganismo marino, *Zooglea* spp., cuando se encuentra en solución es capaz de adsorber iones metálicos como cromo, hierro y plomo (Kumar, *et al.*, 2007). Otros exopolisacáridos capaces de adsorber metales pesados son los producidos por *Paenibacillus jamilae* (Morillo Perez, *et al.*, 2008) y *Enterobacter cloacae* (Iyer, *et al.*, 2005).

1.3.4.4 Otras aplicaciones industriales

Además de las aplicaciones industriales previamente descritas en la industria alimentaria y médico-farmacéutica, existen numerosas aplicaciones que pueden estar asociadas a diversos procesos industriales.

En la industria petrolífera, los EPS se emplean en la extracción del petróleo en los procesos de llenado y recuperación del mismo actuando como viscosizantes. Se requiere el empleo de un fluido pseudoplástico, en el que la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla. Durante la operación de perforación, las soluciones deben ser lo suficientemente fluidas para facilitar el bombeo de la mezcla, y cuando la operación se detiene, la viscosidad debe aumentar para que los sólidos se mantengan en suspensión y poder ser estables bajo condiciones extremas de temperatura y pH. El xantano se emplea como aditivo en muchas etapas del proceso de perforación, producción, transporte y procesamiento del crudo (Sutherland, 1990).

Por otro lado, las células microbianas anteriormente descritas, se pueden emplear en la fabricación de membranas acústicas flexibles utilizadas en auriculares o como endurecedor en adhesivos, entre otros (Jonas & Farah, 1998; Sutherland, 1998). El gelano, además de las aplicaciones previamente descritas para la industria alimentaria, puede emplearse como sustituto del agar en microbiología o, en su forma nativa y mezclado con almidón, puede ser usado como molde de tamaño en la fabricación de papel (Sutherland, 1998).

OBJETIVOS

Los probióticos son “*microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedador*” (FAO/WHO, 2002). Sus efectos beneficiosos sobre la salud humana han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante numerosos estudios desde la época de Metchnikoff y en la mayoría de los casos estos efectos son dependientes de la viabilidad del microorganismo en el lugar de acción. No siempre esto se consigue, ya que el microorganismo ha de soportar condiciones desfavorables tanto en el vehículo en el que es administrado, relacionadas con las características del producto alimentario (acidez del producto, interacción con otros microorganismos, oxigenación, temperatura de almacenamiento, entre otros), como en el tracto gastrointestinal (acidez en el estómago, sales biliares, enzimas digestivas) cuando son administradas por vía oral.

Para intentar mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos a diferentes procesos tecnológicos o bien a las condiciones de los tractos en que se administrarán, se han estudiado diferentes métodos, que incluyen incrementar la resistencia de cepas probióticas a pH ácido y sales biliares mediante exposición progresiva a concentraciones crecientes de los mismos. En la actualidad, está cobrando importancia la protección física de estos microorganismos mediante técnicas de encapsulación, las cuales han venido demostrando su eficacia en los últimos años. Sin embargo, las técnicas de encapsulación y los materiales de encapsulación empleados pueden variar dependiendo del estudio, así como también existe una carencia de estudios *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos a nivel de laboratorio.

Por otro lado, poco a poco se han introducido con éxito algunos exopolisacáridos microbianos como material de encapsulación, por ejemplo, el gelano y el xantano. Es por ello y por las posibilidades que ofrecen algunos polímeros microbianos por sus propiedades gelificantes, que resulta interesante plantearse el uso de nuevos polímeros microbianos como material de encapsulación.

Por tanto, y de acuerdo con lo descrito anteriormente, se plantean los siguientes objetivos para el presente trabajo de investigación:

1. Evaluación de la capacidad de diferentes polímeros microbianos para encapsular microorganismos probióticos y estudio del

impacto de la encapsulación sobre la viabilidad de las cepas probióticas.

2. Evaluación de la estabilidad a lo largo del tiempo de los microorganismos encapsulados para establecer las condiciones óptimas de almacenamiento.
3. Evaluación *in vitro* de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular frente a diferentes pH y a condiciones gastrointestinales simuladas. Efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas sobre determinadas propiedades probióticas.
4. Estudios *in vivo* de colonización y tránsito intestinal y del impacto de la administración de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular sobre los principales grupos microbianos fecales mediante técnicas de biología molecular.
5. Evaluación *in vivo* de la respuesta biológica derivada de la administración de los probióticos encapsulados y sin encapsular.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos probióticos

Las cepas utilizadas en este estudio proceden de colecciones de cultivo y fueron seleccionadas por sus propiedades probióticas.

3.1.1 Cepas probióticas

Se seleccionaron para este estudio tres microorganismos, siendo dos cepas del género *Lactobacillus* y una del género *Bifidobacterium*:

-*Lactobacillus plantarum* CRL 1815 (Colección de cultivos del Centro de Referencia para Lactobacilos)

-*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (American Type Culture Collection o colección de cultivos tipo americana) (Figura 13)

-*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (American Type Culture Collection o colección de cultivos tipo americana) (Figura 13)

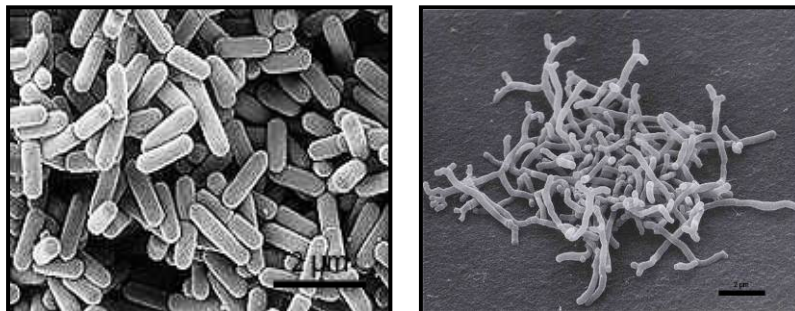


Fig.13 Fotografías al microscopio electrónico de barrido.
a) *Lactobacillus rhamnosus*; b) *Bifidobacterium longum*.

L.plantarum CRL 1815, de origen vaginal, fue cedida por el CERELA (Centro de Referencia de Lactobacilos, Tucumán, Argentina) por sus propiedades probióticas para el desarrollo del presente trabajo de tesis. *B.longum* ATCC BAA-999, también conocida como *B. longum* BB536, está registrada en la ATCC como cepa probiótica (Namba, *et al.*, 2010; Ogata, *et al.*, 1999; Xiao, *et al.*, 2006a), así como también *L.rhamnosus* ATCC 53103, cepa también conocida como *Lactobacillus* GG, ampliamente utilizada en investigación por sus demostradas propiedades probióticas (Carr, *et al.*, 2002; Hojsak, *et al.*, 2010; Johannsen & Prescott, 2009)

3.1.2 Condiciones y medios de cultivo

3.1.2.1 Medios de cultivo

A- Género *Lactobacillus*

Para el cultivo de las cepas del género *Lactobacillus* se utilizó el medio MRS (Man, Rogosa, Sharpe) (Merck KGaA). Este medio está basado en las formulaciones de deMan, Rogosa y Sharpe y, aunque no es selectivo, favorece el aislamiento y cultivo de bacterias del ácido láctico como el género *Lactobacillus* (Sharpe, 1966), en el que crecen como típicas colonias blanquecinas. La composición por litro se detalla en la tabla 11.

Tabla 11. Composición por litro del medio MRS

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	4
D-(+)-glucosa	20
Tween 80	1
Citrato amónico	2
Acetato sódico	5
Sulfato magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,04
Fosfato dipotásico	2
Agar (para medio sólido)	15
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL
pH final de 5.7 ± 0.2 a 25°C	

Este medio se esterilizó a $115^{\circ}\text{C}/30\text{min}$. Se empleó en forma sólida para enumeración de microorganismos en placas de agar y en forma líquida para la obtención de masa bacteriana.

B- Género *Bifidobacterium*

El cultivo de *B. longum* ATCC BAA-999 se realizó igualmente en medio MRS (Merck KGaA), el cual se suplementó para favorecer el crecimiento de esta cepa con hemina, L-cisteína y vitamina K₁ en las siguientes cantidades (Tabla 12), con excepción de los medios empleados en los test de supervivencia, en cuyo caso se suplementó únicamente con L-cisteína.

Tabla 12. Suplementos para el crecimiento de *B. longum* ATCC BAA-999

Compuesto	Cantidad (mL)
Solución de L-cisteína·HCl	11,1
Solución de Hemina	10
Solución de Vitamina K ₁	0,2

Para ello se prepararon soluciones concentradas de cada uno de los componentes, cuya composición y preparación se detalla en las tablas 13, 14 y 15.

Tabla 13. Solución de L-cisteína (45 g/L)

Compuesto/Conservación	Cantidad
L-cisteína clorhidrato	4,5 g
Agua destilada	c.s.p. 100 mL
Esterilización por filtración	
4°C/Protegido de la luz	

Tabla 14. Solución de Hemina (0,5 g/L)

Compuesto/Conservación	Cantidad
Hemina	50 mg
1N NaOH	1 mL
Agua destilada	c.s.p. 100 mL
Esterilización por filtración	
4°C	

Tabla 15. Solución de Vitamina K₁

Compuesto/Conservación	Cantidad
Vitamina K ₁	0,15 mL
95% Etanol	30 mL
4°C/Protegido de la luz	
Descartar al mes	

Estas soluciones se añadieron al medio MRS tras su esterilización a 115°C/30 min, una vez éste fue atemperado. El medio así obtenido también se empleó en forma sólida para enumeración de microorganismos placas y en forma líquida para la obtención de masa bacteriana.

C- Almacenamiento de las cepas

Las cepas probióticas se almacenaron a -20 °C en medio *Leche-extracto de levadura* (Tabla 16) para su conservación. Dicho medio, una vez preparado, se esterilizó a 115°C/30 min y se alicuotó en criotubos de 1 mL para la adición de la masa bacteriana previo a su congelación.

Tabla 16. Composición por litro del medio Leche-extracto de levadura

Compuesto	Cantidad
Leche descremada	100 g
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL
pH final de 6*	

*Ajustado con HCl 1N y NaOH 1M

3.1.2.2 Condiciones de cultivo

Todos los microorganismos fueron almacenados en leche-extracto de levadura a -20°C y subcultivados 2 veces en el medio apropiado antes de la inoculación final.

A- Cultivo en medio líquido

Para la obtención de masa bacteriana, *L.plantarum* CRL 1815 y *L.rhamnosus* ATCC 53103 se cultivaron en 400 mL de medio MRS a 37°C durante 18-20 horas. *B.longum* ATCC BAA-999 se cultivó en 2 matraces con 200 mL de medio MRS suplementado en atmósfera anaerobia mediante el

empleo de jarras de anaerobiosis (Anaerojar[®], Oxoid) y sobres Anaerogen[®] (Oxoid), a 37°C durante 40 horas

B- Cultivo en medio sólido

Las placas de medio sólido de *L. plantarum* CRL 1815 y *L. rhamnosus* ATCC 53103 se incubaron a 37°C durante 30 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ gracias al uso de sobres CO₂ Gen[®] (Oxoid), mientras que las de *Bifidobacterium* se incubaron a 37°C durante 48 horas en anaerobiosis empleando sobres Anaerogen[®] (Oxoid), utilizando en ambos casos jarras de anaerobiosis (Anaerojar[®], Oxoid) para este propósito.

3.2 Polímeros Microbianos

Los polímeros empleados en esta tesis para la obtención de cápsulas/perlas son algunos de origen comercial mientras que otros fueron obtenidos a nivel de laboratorio.

3.2.1 Polímeros microbianos de origen comercial

Los polímeros comerciales empleados y su procedencia se detallan en la tabla 17. Todos ellos están incluidos en la categoría GRAS (Generalmente reconocidos como seguros).

Tabla 17. Polímeros comerciales empleados en la encapsulación.

Nombre	Microorganismo productor	Casa comercial	Referencia
Gelano	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Sigma	(Giavasis, <i>et al.</i> , 2000)
Xantano	<i>Xanthomonas campestris</i>	Sigma	(García-Ochoa, <i>et al.</i> , 2000)
Pululano	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fluka	(Deshpande, <i>et al.</i> , 1992)

3.2.2 Polímeros microbianos obtenidos a nivel de laboratorio

El polímero microbiano obtenido a nivel de laboratorio empleado en este trabajo es el “jamilano”, polisacárido extracelular obtenido de *Paenibacillus jamilae* CECT 5266, cepa descrita previamente por nuestro grupo de trabajo (Aguilera, *et al.*, 2001; Aguilera, *et al.*, 2008).

3.2.2.1 Obtención de Exopolisacárido de *Paenibacillus jamilae* CECT 5266

La producción y extracción del jamilano se ha realizado según la metodología descrita por García Ribera (2003).

A- Medio de cultivo

Para la obtención del polímero se cultivó la cepa *P. jamilae* CECT 5266 en medio EP al 5 % de sacarosa (García Ribera, 2003; Morillo Perez, *et al.*, 2008), cuya composición se detalla en la tabla 18.

Tabla 18. Composición del medio EP al 5%

Compuesto	Cantidad
Sacarosa	50 g
KNO ₃	5,1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0,8g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	40 mg
CaCl ₂	10 mg
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	20 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	10 mg
Extracto de levadura	0,1 g
Peptona	0,1 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 mL

B- Producción del exopolisacárido

El cultivo de *P. jamilae* CECT 5266 se realizó en un fermentador de tanque agitado BIOSTAT B (Braun-Biotech) (Figura 14) con un vaso de 2L de capacidad con camisa para baño termostatzado al cual se le adiciona 1L de medio EP al 5%. Las condiciones de cultivo, controladas de manera automatizada por el dispositivo, son las siguientes:

- Temperatura : 30°C
- pH: 7 ± 0.05 (a través de soluciones de NaOH 1N y HCl 1N)
- Agitación: 150 rpm
- Aireación: a saturación de oxígeno

Por último, la formación de espuma debida a la agitación se controló con la adición de 1 mL de Polipropilenglicol P2'000 (Fluka) al medio de cultivo.



Fig.14 Fermentador Biostat B en el que se cultivó *P.jamilae* CECT 5266

Esta unidad de fermentación se esterilizó en autoclave a 115°C durante 30 minutos con el medio de producción y una vez que se tuvieron todos los parámetros del fermentador controlados, se añadió el inóculo, cultivándose en el fermentador durante 72 horas.

Para la inoculación de fermentador se utilizó un cultivo joven del microorganismo en medio EP al 5% líquido (30°C, 24 horas, 100 rpm), siendo el volumen del inóculo del 10% con respecto al volumen final del fermentador.

C- Extracción del EPS producido por *P. jamilae* CECT 5266 (Figura 15)

Transcurridas 72 horas de crecimiento, el medio de cultivo con la masa bacteriana se diluyó con un volumen igual de agua destilada y se centrifugó a 9000 rpm, 30min para retirar las células. El exopolisacárido (EPS) se extrajo del sobrenadante libre de células, precipitándolo con un 2% de NaCl y la adición de 2 volúmenes de etanol 96° a -20°C, dejándolo en reposo a -20°C toda la noche.

Posteriormente el precipitado se centrifugó a 5000 rpm, 10min descartando el sobrenadante, y se dejó secar 24-48 horas. Una vez que el precipitado estuvo seco, se resuspendió en agua destilada y esta suspensión se dializó durante 48 horas (membranas Medicell Internacional Ltd, size 7 Inf Dia 30/32"- 23.8mm: 30 M (Aprox) MWCO-12-14000 Daltons) en agua destilada a 4°C con agitación magnética constante. Finalmente el polímero dializado se liofilizó, determinando por gravimetría la producción resultante.

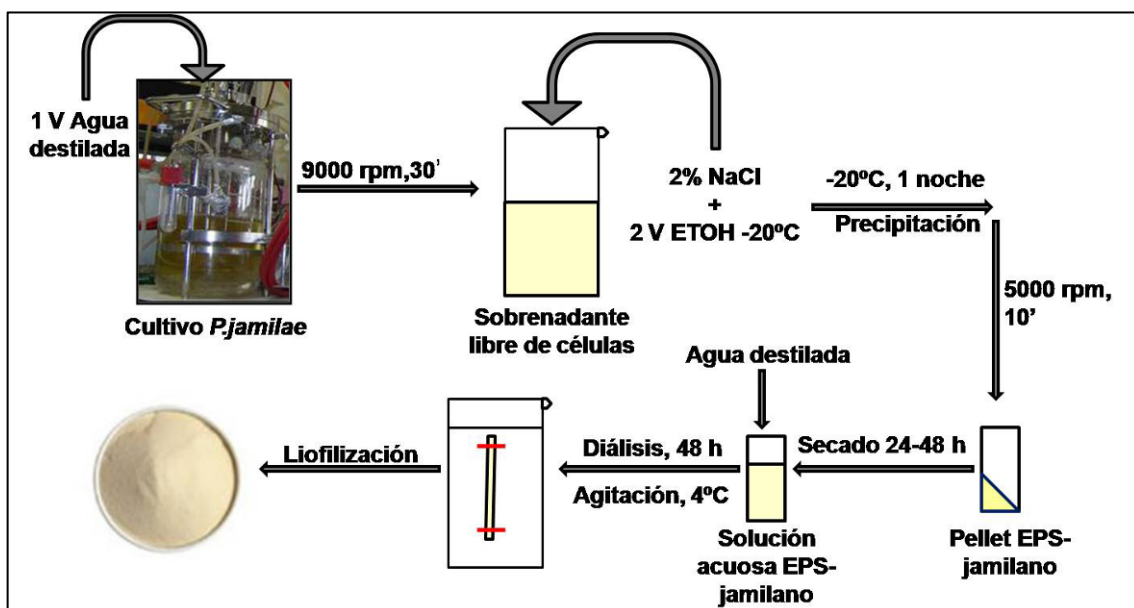


Fig. 15 Proceso de extracción del jamilano a partir de un cultivo de *P. jamilae* CECT 5266

C.1- Preparación de las membranas de diálisis

Para la preparación de las membranas de diálisis, éstas se cortaron dejándolas con 20-25 cm de longitud y se hirvieron durante 10 minutos en agua destilada con 2% de NaHCO_3 y 1mM de EDTA (Ácido Etilen-diamino-tetraacético). Transcurrido este tiempo se lavaron con agua destilada y se hirvieron nuevamente en agua destilada con 1mM de EDTA. Finalmente se realizó un último lavado con agua destilada y las membranas se guardaron en etanol al 70% a 4°C, protegidas de la luz. En el momento previo a su empleo, las membranas se lavaron bien con agua destilada, realizando 2 lavados sucesivos.

3.2.3 Preparación de los polímeros microbianos para la encapsulación

Tanto los polímeros comerciales como el jamilano liofilizado se dispersaron en 15 mL de agua desionizada precalentada a 80°C mediante agitación magnética y se mantuvieron a esta temperatura con agitación suave hasta la completa hidratación de los polímeros. Las soluciones resultantes se autoclavarón a 121°C/15min y se almacenaron a 4°C hasta su uso (4 días como máximo).

Mediante este procedimiento se preparó un rango de concentraciones de entre 2% y 0,5% de los 4 polímeros microbianos anteriormente citados (gelano, xantano, pululano y jamilano) así como también mezclas de gelano (2%-0,5%) con el resto de los polímeros (0.2%-1,5%). En el caso de las mezclas de polímeros, se mezclaron inicialmente en forma de polvo y se hidrataron conjuntamente a las concentraciones deseadas.

3.3 Encapsulación de microorganismos probióticos

3.3.1 Preparación de los concentrados bacterianos

Se prepararon concentrados de los microorganismos probióticos en agua estéril para su encapsulación. Para ello se centrifugaron los cultivos bacterianos (400 mL) a 5000 rpm, 15min. El sedimento de masa bacteriana resultante se lavó 2 veces con agua estéril con el fin de retirar cualquier traza de medio de cultivo, dado que los iones podrían interferir en la encapsulación. Tras el lavado se resuspendió la masa bacteriana en 5 mL de agua estéril y se mantuvo a 4°C hasta su uso (máximo 1 día).

3.3.2 Técnica de inmovilización

En la encapsulación de microorganismos probióticos se han empleado dos metodologías basadas en la técnica de goteo o extrusión (Kailasapathy, 2002; Krasaekoopt, *et al.*, 2003). La terminología adecuada que se emplea para nombrar las cápsulas resultantes es la de “beads”, traducida literalmente como gotas, cuentas, bolitas o perlas. En la presente tesis nos referiremos a “perlas”, considerando este término más apropiado en el contexto de forma farmacéutica o de administración en el que se encuentra.

3.3.2.1 Método de extrusión o goteo

El método empleado está basado en el descrito por Sun & Griffiths (2000). El procedimiento seguido, cuyo esquema se presenta en la figura 16 y el cual se ha llevado a cabo en condiciones estériles, fue el siguiente:

Se añadió 1 mL de concentrado bacteriano, pre-calentado a 37°C, a 15 mL de una solución de polímeros microbianos, pre-calentada a 58°C, y se agitó brevemente mediante agitación magnética para conseguir una mezcla homogénea antes de la encapsulación.

Rápidamente, para evitar que la mezcla se enfríe, ésta fue extruida con la ayuda de una bomba de jeringa (kdScientific) a través de una jeringa de 20

mL (Terumo) conectada a una aguja (TIP 25 GA. 0,010min Precision Stainless Steel Tips, EFD con un flujo de 120 mL/h, sobre una solución de recogida de cloruro cálcico 0,1 M (Panreac) con una agitación magnética suave.

Una vez formadas las perlas se dejaron endurecer en el cloruro cálcico durante 1 hora y transcurrido este tiempo se separaron con la ayuda de un colador de acero inoxidable estéril. Las perlas se conservaron en placas petri estériles a 4°C hasta su uso (máximo 1 día).

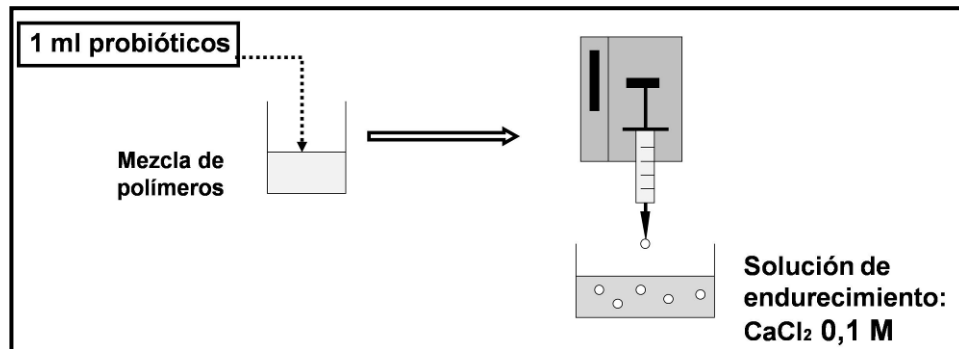


Fig. 16 Esquema del método de encapsulación por goteo

3.3.2.2 Método del generador electrostático de goteo

Este método es una modificación del método de goteo, con la diferencia de que en este caso se aplica un potencial electrostático entre la aguja y la solución de recogida. La aplicación de este potencial electrostático causa repulsión entre las cargas eléctricas superficiales y disminuye la tensión superficial, lo que lleva a una reducción en el tamaño de gota (Poncelet, *et al.*, 1999).

Para esta metodología se utilizó un *generador electrostático de goteo* (Figura 17), dispositivo compuesto por una jeringa, acoplada a una bomba de jeringa, que se conecta a una aguja mediante un conector metálico, y una fuente de alimentación de alto voltaje que, por un lado, va a estar conectada al conector metálico, transmitiéndole el potencial electrostático y, por otro, a una pieza metálica que se encuentra debajo del recipiente de la solución de recogida, que va a actuar como toma a tierra.

El procedimiento seguido en cuanto a la preparación de la mezcla del polímero con el concentrado probiótico fue idéntico al descrito para el método

por goteo, así como también el proceso de endurecimiento y recogida de las perlas.

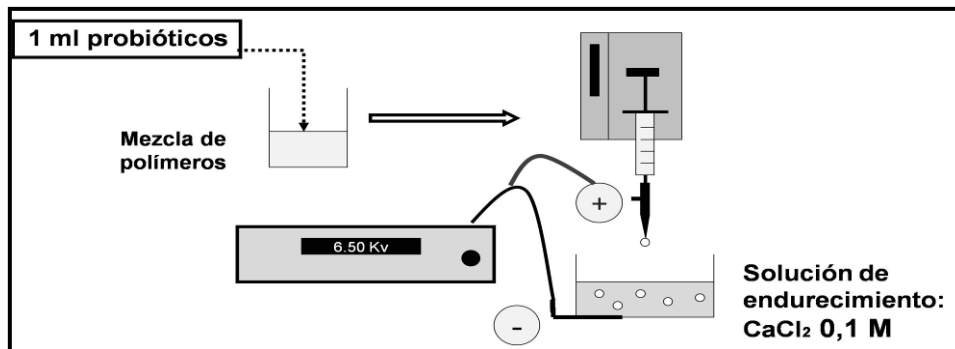


Fig.17 Esquema del método del generador electrostático de goteo

La diferencia radica en la metodología de preparación, de tal manera que la mezcla polímero-probiótico fue extrudida con la ayuda de una bomba de jeringa (kdScientific), a través de una jeringa de 20 mL (Terumo) conectada a una aguja (TIP 25 GA. 0,010min ESD SAFE, EFD) mediante un conector metálico, el cual ayuda a conducir el potencial electrostático, sobre una solución de recogida de cloruro cálcico 0,1 M (Panreac) agitada magnéticamente (Figura 18). El flujo de extrusión fue de 120 mL/h mientras que el potencial aplicado entre la aguja y la solución de recogida fue de 6,5 kV.

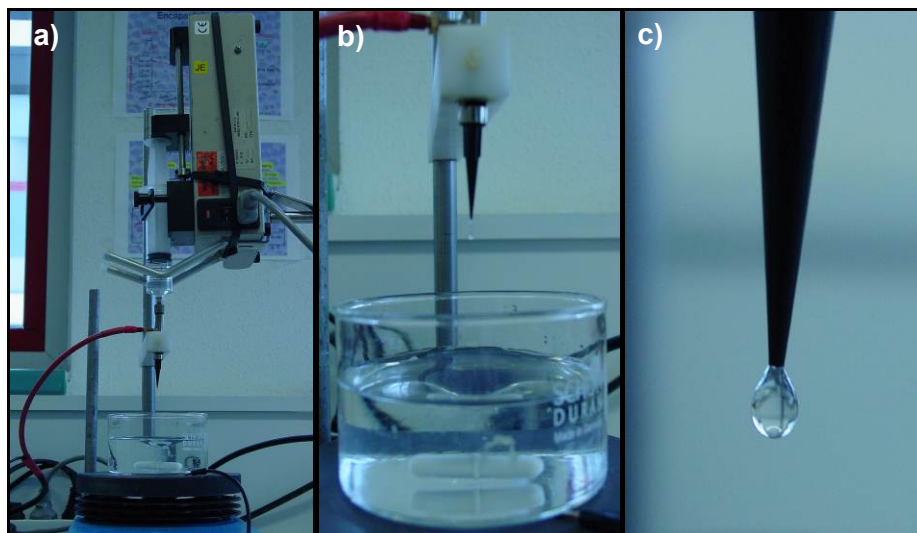


Fig. 18 Detalle del proceso de encapsulación mediante generador electrostático de goteo. a) Dispositivo; b) Caída de la gota y recogida; c) Formación de la gota.

3.3.3 Determinación de características físicas de las perlas

3.3.3.1 Determinación del tamaño de las perlas formadas

El tamaño de las perlas se determinó con el programa de análisis de imagen Visilog 6.2 (Noesis, Les Ulis, Courtaboeuf, Francia). Para ello se tomaron fotos, directamente de un microscopio estéreo SZT 300 (VWR International Eurolab, Barcelona, España) empleando una cámara Moticam 1000 (Motic Instruments Inc., Canadá), de las perlas amplificadas (Figura 19).



Fig. 19 Microscopio estéreo para la toma de imágenes de perlas

3.3.3.2 Observación de la morfología al microscopio electrónico de barrido (SEM)

La morfología externa de las perlas con bacteria inmovilizada se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, las perlas se prepararon en la Unidad de Preparación de Muestras Biológicas del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada de acuerdo al siguiente protocolo:

Las perlas se fijaron en una solución de Glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0,1M, pH=7,4 durante 2 horas, a 4°C, tras lo cual se lavaron en el mismo tampón (3 cambios de 15 min a 4°C), para posteriormente realizar una post-fijación con tetróxido de osmio al 1%, en oscuridad, durante 1 hora y a

temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado en agua destilada (3 cambios de 5 min cada uno) previo a someter a la muestra a una deshidratación en un gradiente de concentraciones crecientes de Etanol (50%, 70%, 90%, 15 min y 100 %, 2 cambios de 15 min). Finalmente las muestras se desecaron por el Método por punto Crítico (Anderson, 1951) con dióxido de carbono en un Secador de Punto Crítico Polaron CPD7501 y se recubrieron por Evaporación de Carbón (Evaporador HITACHI).

Una vez preparadas las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido DSM 950 Zeiss, LEO 1530 en la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución del CIC de la Universidad de Granada.

3.3.3.3 Determinación de la temperatura de fusión de los geles de polímeros microbianos

Los geles formados por las mezclas de polímeros, y que posteriormente se emplearon para encapsular, se sometieron a análisis térmico con el objetivo de determinar si su temperatura de fusión (T_f) estaba dentro de las temperaturas de nuestro rango de trabajo, lo que llevaría a la desintegración de las perlas durante los experimentos.

Para ello se hidrataron los polímeros como se describió en el punto 3.2.3 y se llevó a cabo un análisis calorimétrico diferencial (DSC) en un DSC Pyris 6 (Perkin Elmer), utilizando un gradiente de temperatura de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, desde una temperatura inicial de 20°C y hasta alcanzar 90°C , manteniendo las muestras inicialmente a 20°C durante 5 min para permitir que la temperatura se estabilice. Esta prueba se realizó por duplicado.

3.3.3.4 Determinación de las características mecánicas de las perlas

El comportamiento mecánico de las perlas con bacteria inmovilizada, preparadas como se ha descrito en el punto 3.3.2.2, se determinó realizando un análisis mecánico diferencial (DMA) en un DMA Q800 (TA Instrument Inc.).

Éste consta de un “clamp” o abrazadera (Figura 20) con un plato inferior fijo y un plato superior oscilante que va a aplicar una fuerza determinada sobre la muestra colocada entre ambas partes. Los datos obtenidos, como la deformación resultante debido a la aplicación de dicha fuerza, se han recogido y analizado mediante el programa Universal V4.1D TA Instruments.

Para la realización de este análisis de compresión, una perla se colocó entre ambos platos, sobre la superficie fija, y se realizó un barrido de presión con una frecuencia fija de 1Hz y una amplitud de 1-10 μm . Las medidas se realizaron por triplicado para cada combinación de polímeros empleada en la obtención de perlas.

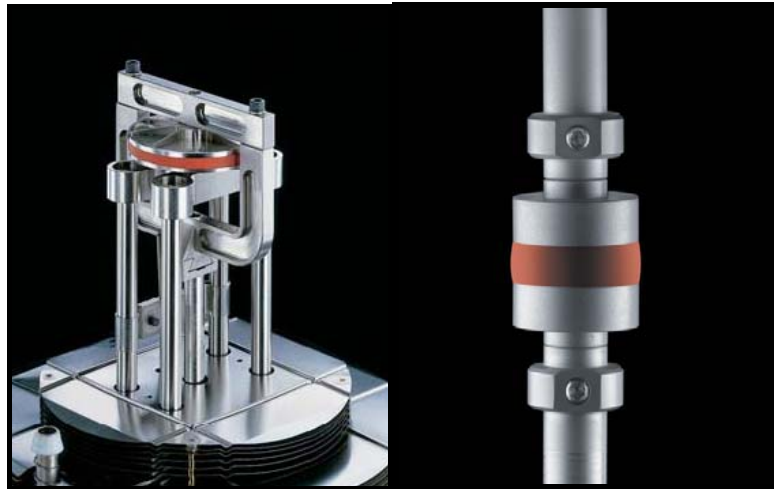


Fig. 20 Cabezal de compresión acoplado al DMA para estudios de compresión.

3.3.4 Optimización del método de desintegración de las perlas

El recuento de los microorganismos inmovilizados solo es posible cuando éstos son liberados del interior de la perla para su siembra y enumeración en placas de agar. Teniendo esto en mente, se ensayaron diferentes técnicas empleando diferentes tampones con el fin de conseguir la completa desintegración de las perlas. Para ello se añadió un gramo de perlas con bacteria inmovilizada a 10 mL del tampón correspondiente para a continuación someterlas a la correspondiente técnica en ensayo. Los métodos empleados así como los buffers usados se detallan en las tablas 19 y 20.

Tabla 19. Métodos ensayados para la desintegración de las perlas

Método	Tiempo	Referencia
Agitación	30min	(Sheu & Marshall, 1993)
Sonicación	30min	(McMaster, <i>et al.</i> , 2005b)
Stomacher	6min	(Cinquin, <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 20. Tampones ensayados para la desintegración de las perlas

Tampón	Referencia
Tampón Fosfato Sódico 0,05 M, pH 7	(Sun & Griffiths, 2000)
Tampón Fosfato Sódico 0,1 M, pH 7	(Chandramouli, <i>et al.</i> , 2004)
Tampón Fosfato Sódico 0,2 M, pH 7	(Chandramouli, <i>et al.</i> , 2004) modificado
Tampón Fosfato Sódico 1 M, pH 6,8	(McMaster, <i>et al.</i> , 2005b)
EDTA 1%, pH 7	(Cinquin, <i>et al.</i> , 2004)

3.3.5 Procedimiento de enumeración de microorganismos

Para la cuantificación de microorganismos en el concentrado probiótico en agua estéril, así como de las cepas probióticas crecidas en distintos medios, se tomaron alícuotas con las que se realizaron diluciones seriadas en Tampón salino de fosfato (PBS, Sigma) estéril y se sembraron, por triplicado, 10µL de las diluciones apropiadas en placas de MRS agar, para los lactobacilos, y de MRS agar suplementado con L-cisteína, hemina y vitamina K₁ para *B.longum* ATCC BAA-999.

La liberación de los microorganismos probióticos inmovilizados en las perlas para su posterior cuantificación se realizó añadiendo 1 g de perlas en 10mL del buffer seleccionado, empleando el método apropiado de disgregación tras su puesta a punto. Tras su liberación, se tomó 1 mL de la suspensión de células resultante de la desintegración de las perlas y se realizaron diluciones seriadas en PBS. Como se ha descrito para el concentrado bacteriano, se sembraron, por triplicado, 10µL de las diluciones apropiadas en placas de MRS agar, para los lactobacilos, y de MRS agar suplementado con L-cisteína, hemina y vitamina K₁ para *B.longum* BAA-999.

Las condiciones de cultivo fueron las mismas en ambos casos (concentrado y perlas) y fueron las descritas en el apartado 3.1.2.2.B.

3.3.6 Evaluación de la viabilidad de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular a largo plazo.

Con el fin de evaluar si la inmovilización en polímeros microbianos permite mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos en estudio, prolongándolas en el tiempo, así como también determinar la temperatura idónea de almacenamiento, se realizó un estudio de viabilidad a lo largo de 90 días (Figura 21).

Para ello se realizó la cuantificación de las 3 cepas probióticas (*L.plantarum* CRL 1815, *L. rhamnosus* ATCC 53103 y *B.longum* ATCC BAA-999), tanto inmovilizadas como libres, cada 15 días hasta un máximo de 90 días. Se prepararon, con este fin, alícuotas de 1 g de perlas y 1 mL de concentrado probiótico (apartado 3.3.1), que se almacenaron en microtubos de 1,5 mL estériles, tanto a 25°C como a 4°C. La concentración inicial de los microorganismos inmovilizados fue del orden de $9,18 \pm 0,81$ UFC/g de perlas, mientras que la de los libres fue del orden de $10,58 \pm 0,60$ UFC/mL.

En el día de muestreo, se tomó 100 μ L de las alícuotas de concentrado bacteriano e, igualmente, se tomó 1 g alícuotado de perlas, que se disgregó para la liberación del microorganismo. En ambos casos se realizaron diluciones seriadas en PBS para su posterior recuento en placa como se ha descrito en el punto anterior (3.3.5).

Todo el estudio se realizó por duplicado.

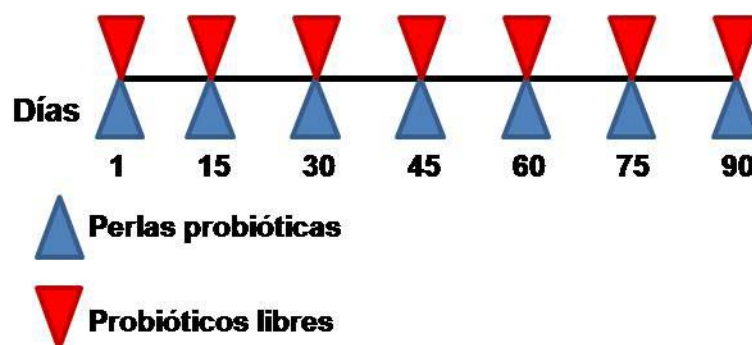


Fig. 21 Esquema de toma de muestra en la evaluación de la viabilidad a largo plazo.

3.4 Estudios *in vitro* de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral.

Dentro de este apartado se incluyen estudios de supervivencia de los microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular ante condiciones adversas, tanto gastrointestinales simuladas como rangos de pH, así como también se comprobará si estas condiciones van a afectar a ciertas propiedades probióticas de las cepas empleadas.

3.4.1 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en diferentes pH.

Las cepas probióticas libres (ensayadas a un nivel inicial del orden de $8,63 \pm 0,44$ UFC/mL) e inmovilizadas (nivel inicial del orden de $8,86 \pm 0,80$ UFC/mL) fueron expuestas a 9 mL de caldo MRS ajustado a diferentes pH con HCl 37% y NaOH 1M. Para ello se añadieron 90 μ L de concentrado probiótico o 1 g de perlas con bacteria inmovilizada, respectivamente, al correspondiente medio. En el caso de *B.longum* ATCC BAA-999, el medio se suplementó con 0.05% L-cisteína. Las condiciones del estudio se detallan en la tabla 21.

Tabla 21. pH ensayado y tiempos de toma de muestra.

pH	Toma de muestra*
2	2 h
3,5	4 h
5	6 h
6,5 (control)	24 h

*Realizada con cada uno de los pH ensayados

Las muestras se tomaron, en el caso de las perlas, tanto de las perlas como del medio sobrenadante con el fin de determinar si se produjo la liberación de los microorganismos desde las perlas al medio durante el ensayo. En el caso de las perlas, el sobrenadante fue descartado cuidadosamente por decantación. El recuento bacteriano se llevó a cabo como se ha descrito

anteriormente en el punto 3.3.5, siguiendo el sobrenadante de las perlas la metodología propia de los microorganismos sin encapsular.

Este estudio se llevó a cabo por duplicado.

3.4.2 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en condiciones gastrointestinales simuladas.

3.4.2.1 Optimización de las condiciones del ensayo mediante técnicas espectrofotométricas

A- Crecimiento de cepas probióticas en medio líquido

Dado que para la realización de los diferentes ensayos es necesario conocer la cinética de crecimiento, fue necesario optimizar las condiciones de cultivo en medio líquido, conocer las distintas fases de crecimiento, y realizar curvas de calibración de DO y UFC/ml. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento de cada uno de los microorganismos, tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis.

Los microorganismos se inocularon al 2% (V/V) en placas microtiter estériles de 96 pocillos (Deltalab) en las que se distribuyeron 200 μ L de MRS por pocillo, suplementado con 0,05% L-cisteína para *B.longum* ATCC BAA-999. Para la preparación del inóculo, transcurridas 16-18 horas de crecimiento, 5 mL del medio correspondiente se centrifugaron a 2000rpm durante 10 min para reducir los azúcares del medio, y el sedimento se resuspendió en 5 mL de PBS estéril, alcanzando una concentración de 10^9 - 10^{10} ufc/mL.

El cultivo en ambos casos se llevó a cabo a 37°C, consiguiéndose la anaerobiosis con jarras de anaerobiosis y sobres Anaerogen[®], generadores de atmósfera anaerobia. Las medidas se hicieron a las 2, 4, 6, 8, 24, 26, 28 y 30 horas de crecimiento a una longitud de onda de 550 y 650 nm en un lector microELISA (Behring EL 311).

Los ensayos se realizaron por triplicado, empleando controles internos sin inocular en todos los casos.

B- Estudio del crecimiento puntual de las cepas probióticas frente a condiciones gastrointestinales simuladas

Con el objetivo de optimizar las condiciones de crecimiento que permitieran el estudio de supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, se realizó un ensayo con las 3 cepas probióticas en estudio para conocer su comportamiento en un amplio rango de pH, así como también frente a un rango de concentraciones de bilis, pepsina y pancreatina.

B.1- Preparación de las condiciones de ensayo

Se utilizaron placas microtiter estériles de 96 pocillos, siguiendo el mismo protocolo que se empleó para estudiar la cinética o curva de crecimiento de los microorganismos en cuanto a volumen de medio por pocillo, preparación del inóculo y su adición al medio. Igualmente, los medios destinados al ensayo con la bifidobacteria fueron suplementados con 0,05% L-cisteína.

En todos los casos las condiciones testadas tuvieron como base MRS caldo y las condiciones deseadas se alcanzaron mediante la adición de los reactivos adecuados. Tanto las condiciones como los reactivos empleados se detallan en la tabla 22.

Tabla 22. Condiciones ensayadas en el estudio

Condiciones	pH	Concentración final reactivo
pH*	2; 3; 4; 5; 6,5(control)	
Bilis (Sigma)	6,5	0,5; 1; 2; 3; 4; 5 % (m/v)
Pepsina (Sigma)	3,5 [†]	0,01;0,02; 0,03; 0,04 % (m/v)
Pancreatina(Sigma)	6,5	0,1;0,2; 0,3; 0,4 % (m/v)

*pH ajustado con HCl 37% y NaOH 1M
[†]pH necesario para que la enzima esté activa (pH 2-4)

Una vez ajustado el pH y añadido el reactivo adecuado, en cada caso, se esterilizaron los medios a 115°C/30min en autoclave y se almacenaron a

4°C hasta su uso. La pepsina y la pancreatina se añadieron posteriormente al autoclavado del medio MRS por ser termolábiles. Para ello se prepararon concentrados de las mismas al 1% y 10%, respectivamente, en agua destilada, se esterilizaron por filtración y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

B.2- Condiciones de cultivo y lectura espectrofotométrica

Las placas microtiter, una vez inoculadas, se incubaron a 37°C, durante 24 horas en el caso de los lactobacilos y hasta 60 horas en condiciones anaerobias en el caso de la bifidobacteria. La anaerobiosis se consiguió con jarras de anaerobiosis y sobres Anaerogen® (Oxoid), generadores de atmósfera anaerobia.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron a $\lambda=550$ nm en un lector MicroELISA (Behring EL 311). Las lecturas se registraron después de 0, 2, 4, 6, 8, 24 horas de incubación en el caso de los lactobacilos y más prolongadas hasta 60 horas en el caso de la bifidobacteria (0, 2, 4, 6, 8, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 36, 38, 40, 42, 44, 60 h).

Cada una de las condiciones se ensayó por duplicado en cada microplaca y se realizaron 2 ensayos por cada cepa, empleando controles internos sin inocular en todos los casos.

C- Evaluación de crecimiento de las cepas probióticas frente a la exposición secuencial en condiciones gastrointestinales simuladas mediante espectrofotometría.

Una vez realizado el ensayo descrito anteriormente, las cepas probióticas se sometieron a condiciones pre-seleccionadas de manera secuencial con el fin de simular el paso a través del tracto digestivo. La metodología empleada, la preparación de los reactivos así como las condiciones de cultivo según el microorganismo en estudio son los descritos en el apartado B del punto 3.4.2.1.

Se ensayaron inicialmente dos pH para el jugo gástrico simulado en todos los casos y tres concentraciones de bilis para *B.longum* ATCC BAA-999, así como dos secuencias temporales. La exposición inicial fue frente al jugo

gástrico simulado, luego se pasó al jugo pancreático simulado y finalmente a la solución de bilis. Las condiciones del ensayo se detallan en las tablas 23 y 24.

Tabla 23. Condiciones del ensayo empleadas con los lactobacilos

	Condiciones medios empleados			Tiempo de exposición	
	Reactivo	Concentración	pH	2-2-2*	4-2-2 ⁺
<i>Jugo gástrico simulado</i>	Pepsina	0,03%	3,5/4	2 h	4h
<i>Jugo pancreático simulado</i>	Pancreatina	0,2%	6,5	2 h	2 h
<i>Bilis simulada</i>	Bilis	3%	6,5	Hasta 24h	Hasta 24h

*2-2-2: 2h Jugo gástrico simulado- 2h Jugo pancreático simulado- 2h Bilis simulada
⁺4-2-2: 4h Jugo gástrico simulado- 2h Jugo pancreático simulado- 2h Bilis simulada

Tabla 24. Condiciones del ensayo empleadas con *B.longum* ATCC BAA-999.

	Condiciones medios empleados			Tiempo de exposición	
	Reactivo	Concentración	pH	2-2-2*	4-2-2 ⁺
<i>Jugo gástrico simulado</i>	Pepsina	0,03%	3,5/4	2 h	4h
<i>Jugo pancreático simulado</i>	Pancreatina	0,2%	6,5	2 h	2 h
<i>Bilis simulada</i>	Bilis	1%/1,5%/2%	6,5	Hasta 48h	Hasta 48h

*2-2-2: 2h Jugo gástrico simulado- 2h Jugo pancreático simulado- 2h Bilis simulada
⁺4-2-2: 4h Jugo gástrico simulado- 2h Jugo pancreático simulado- 2h Bilis simulada

Al finalizar la exposición frente a cada una de las condiciones gastrointestinales, se recogió el contenido de los pocillos en microtubos de 1,5 mL y se centrifugó a 10.000 rpm, 5min. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento se lavó con PBS estéril y se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm, 5min, tras lo cual se descartó nuevamente el sobrenadante. El sedimento final, se resuspendió en el medio con la siguiente condición gastrointestinal simulada y se llevó a una nueva placa microtiter.

Las medidas espectrofotométricas, a $\lambda=550$ nm, se realizaron al inicio y al final de la incubación en cada condición gastrointestinal simulada, a excepción del medio que contenía sales biliares, en cuyo caso se realizaron medidas al inicio, a las 2 y 24 horas y también a las 48 h con *B.longum* ATCC BAA-999. Cada condición se ensayó por duplicado en cada microplaca y se realizaron dos ensayos por cada cepa, empleando controles internos sin inocular en todos los casos.

A partir de esta etapa se seleccionaron las condiciones a ensayar para realizar el estudio paralelo de supervivencia microbiana con perlas y bacterias

sin inmovilizar en condiciones gastrointestinales simuladas que se describe en el siguiente apartado.

3.4.2.2 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en condiciones gastrointestinales simuladas

De manera general y común a las dos metodologías (secuencial y no secuencial), las cepas probióticas libres (ensayadas a un nivel inicial del orden de $8,63 \pm 0,44$ UFC/mL) e inmovilizadas (nivel inicial del orden de $8,86 \pm 0,80$ UFC/mL) fueron expuestas a 9 mL de caldo MRS ajustado a las diferentes condiciones gastrointestinales simuladas para lo cual se añadieron 90 μ L de concentrado probiótico o 1 g de perlas con bacteria inmovilizada, respectivamente, al correspondiente medio. Las condiciones del estudio se detallan en las tablas 25 y 26.

Tabla 25. Condiciones del ensayo empleadas con los lactobacilos.

	Condiciones medios empleados			Tiempo de exposición
	Reactivo	Concentración	pH	
<i>Jugo gástrico simulado</i>	Pepsina	0,03% (m/v)	3,5	2 h
<i>Jugo pancreático simulado</i>	Pancreatina	0,2% (m/v)	6,5	2 h
<i>Bilis simulada</i>	Bilis	3% (m/v)	6,5	Hasta 24h

Tabla 26. Condiciones del ensayo empleadas con *B.longum* ATCC BAA-999.

	Condiciones medios empleados			Tiempo de exposición
	Reactivo	Concentración	pH	
<i>Jugo gástrico simulado</i>	Pepsina	0,03% (m/v)	3,5	2 h
<i>Jugo pancreático simulado</i>	Pancreatina	0,2% (m/v)	6,5	2 h
<i>Bilis simulada</i>	Bilis	2% (m/v)	6,5	Hasta 48h

Esta simulación de las condiciones gastrointestinales se obtuvo como se ha descrito en el apartado B.1 del punto 3.4.2.1., con la diferencia de que en este caso se partió de concentraciones mayores de pepsina y pancreatina para

su preparación, 6% y 30% respectivamente. Igualmente, en el caso de *B.longum* ATCC BAA-999, el medio se suplementó con 0.05% L-cisteína.

Las muestras, en todos los casos, se tomaron al final del tiempo de exposición frente a cada condición, a excepción de la bilis simulada, en cuyo caso el muestreo se realizó a las 2, 24 y 48 horas. Tanto el procedimiento de toma de muestra como la incubación se realizaron como se ha descrito en el punto 3.4.1.

Tanto para las cepas libres como inmovilizadas este estudio se llevó a cabo, por un lado, de manera secuencial con el fin de simular el paso a través del tracto digestivo y, por otro, de manera puntual, para estudiar la posible protección que las perlas pueden ofrecer al microorganismo frente a cada una de las condiciones por separado (Figura 22). En la metodología *no secuencial* únicamente se expondría a una condición por vez, en cambio en la metodología *secuencial*, la exposición se realiza siguiendo una secuencia lógica del tracto gastrointestinal (jugo gástrico simulado→jugo pancreático simulado→bilis simulada). Para ello, se realizó un lavado antes de pasar a la condición siguiente, el que se detalla a continuación tanto para los microorganismos libres como inmovilizados:

A – Cepas probióticas libres

Una vez tomada la muestra para la siembra y cuantificación de microorganismos, los tubos se centrifugaron a 2000 rpm, 10min y se descartó el sobrenadante. Nuevamente se realizó un lavado con 5 mL de agua de peptona 0,5%, pH=6,5, centrifugando posteriormente a 2000 rpm, 10 min. Finalmente se resuspendió el sedimento en el siguiente medio a testar y se llevó a incubación en las mismas condiciones.

B – Cepas probióticas inmovilizadas

Una vez tomada la muestra para la siembra y recuento se retiró cuidadosamente el sobrenadante por decantación, tras lo cual las perlas se lavaron con 5 mL de agua de peptona 0,5%, pH=6,5, retirando igualmente el agua de peptona por decantación tras el lavado. Las muestras que se

procesaron para recuento bacteriano se separaron para la posterior liberación de las perlas. En el resto de muestras, las perlas se resuspendieron en el siguiente medio a testar y se llevaron a incubación en las mismas condiciones.

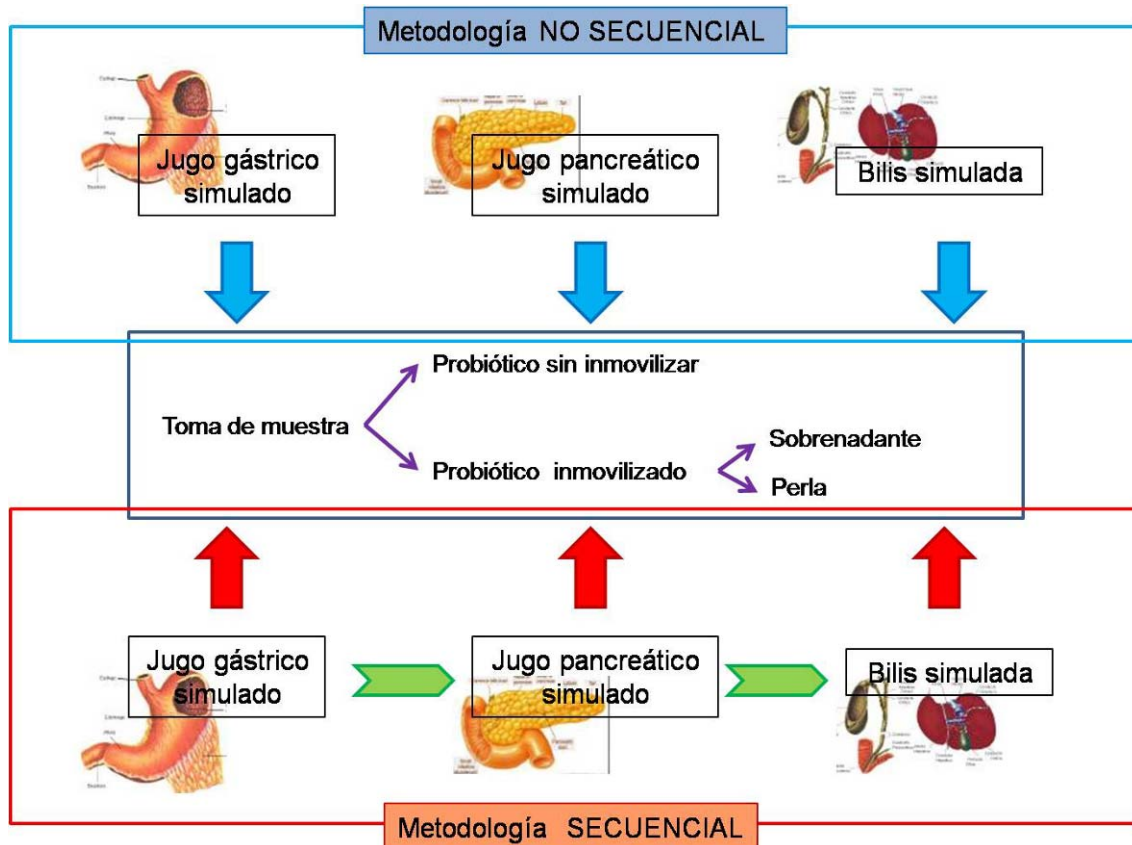


Fig. 22 Esquema de las metodologías empleadas en la evaluación de la supervivencia microbiana frente a condiciones gastrointestinales simuladas

Todo el estudio se llevó a cabo por duplicado para cada metodología empleada (secuencial y no secuencial).

3.4.3 Evaluación del efecto de condiciones gastrointestinales simuladas sobre propiedades probióticas en microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular.

Con el objetivo de evaluar si la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas afectaba a ciertas propiedades probióticas, se estudiaron dos de éstas propiedades: la auto-agregación y la producción de peróxido de hidrógeno.

3.4.3.1 Obtención de masa microbiana

Una vez realizada la cuantificación de microorganismos provenientes de los ensayos de supervivencia frente a condiciones gastrointestinales simuladas, se tomó una colonia aislada con la ayuda de un palillo estéril y se llevó a un tubo con 5 mL de MRS caldo, con las condiciones adecuadas para el cultivo de cada una de las cepas, y se incubó a 37°C y en condiciones de anaerobiosis en los casos necesarios. Este ensayo se realizó con todas las variables del ensayo (metodología, inmovilización o no, diferentes tiempos).

Los perlas con microorganismo probiótico encapsulado se desintegraron previamente para su siembra y recuento, la cual se realizó también con los microorganismos libres. Una vez que la bacteria desarrolló en placas de agar, se actuó de igual forma a partir de estas placas.

3.4.3.2 Efecto sobre el fenómeno de auto-agregación de los microorganismos.

El fenómeno de auto-agregación se manifiesta visualmente por la formación de agregados celulares que sedimentan en corto tiempo. Para cuantificarlo se determinó el *grado de auto-agregación* de la siguiente manera: los microorganismos crecidos en MRS (MRS suplementado para la bifidobacteria) se centrifugaron a 2000 rpm, 15 min y se descartó el sobrenadante. Los sedimentos se lavaron con PBS y se resuspendieron en el mismo tampón hasta una DO a $\lambda=600$ nm de $0,6\pm 0,05$. La agregación de las suspensiones en sedimentación se monitorizó con lecturas espectrofotométricas a 600 nm (DO_{600}) cada hora hasta un máximo de 4 horas.

Los resultados de DO_{600} se emplearon para expresar la auto-agregación en porcentajes aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Auto-agregación (\%)} = \frac{(1-DO_{\text{final}})}{DO_{\text{inicial}}} \times 100$$

El estudio se llevó a cabo por duplicado.

3.4.3.3 Efecto sobre la producción de peróxido de hidrógeno de los microorganismos.

La determinación de la producción de peróxido de hidrógeno de las cepas probióticas se llevó a cabo mediante la aplicación del *método cualitativo en placas de agar*, en el cual la enzima peroxidasa es incorporada en un medio agarizado y cataliza la oxidación de un sustrato cromogénico (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina o TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno.

Se observa que las colonias de las cepas que producen H₂O₂ se colorean de azul en presencia del oxígeno del aire (Berthier, 1993). Los reactivos que se adicionan al agar se detallan en las tablas 27 y 28.

Tabla 27. Solución 17,4 mM de TMB

Compuesto	Cantidad
TMB (Sigma)	12,5 mg
Metanol (VWR International)	3 mL
Esterilización por filtración	
Protegido de la luz	

Tabla 28. Solución de 100 U/mL de peroxidasa

Compuesto	Cantidad
Peroxidasa tipo II (Sigma)	0,5 mg
Agua destilada estéril	1 mL
Esterilización por filtración	
Protegido de la luz	

Las placas se prepararon con 10 mL de MRS agar conteniendo TMB 1 mM (0,6 mL de la solución 17,34 mM de TMB) y 2 U/mL de peroxidasa (0,2 mL de la solución de 100 U/mL de peroxidasa). Para ello, las soluciones de TMB y peroxidasa se añadieron sobre el agar a 40-45°C directamente sobre una placa petri estéril; se adicionó también L-cisteína a una concentración final del 0,05% en las placas de *B.longum* ATCC BAA-999 para favorecer su crecimiento. Una vez se endurecieron las placas y partiendo del tubo de MRS crecido que previamente se preparó (apartado 3.4.3.1), se diseminó el microorganismo

formando estrías con el asa de siembra para obtener colonias aisladas sobre la superficie de las placas de MRS-TMB.

Las placas de lactobacilos se incubaron en microaerofilia, mientras que las de bifidobacteria se incubaron en anaerobiosis (apartado 3.1.2.2.B), ambos a 37°C, durante 48 horas y protegidos de la luz. Al finalizar la incubación, las placas fueron expuestas al aire en condiciones de esterilidad y se observó la coloración azul o marrón de las colonias de microorganismo probióticos capaces de producir H₂O₂. La intensidad del color permitió clasificar a las cepas probióticas como altamente productoras (++), productoras (+) y no productoras (-).

El estudio se llevó a cabo por duplicado.

3.5 Estudios *in vivo* de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral.

Se emplearon modelos murinos para realizar estudios de colonización y tránsito intestinal, así como del impacto de la administración de las cepas probióticas inmovilizadas sobre los principales grupos microbianos fecales. Estos estudios se llevaron a cabo mediante el uso de técnicas moleculares de análisis de comunidades bacterianas, técnicas que se detallan a continuación. Paralelamente se llevaron a cabo estudios inmunológicos de linfoproliferación en respuesta a mitógenos para evaluar la respuesta biológica derivada de ésta administración.

3.5.1 Modelos de experimentación

3.5.1.1. Animales de experimentación

En cada estudio se emplearon 16 ratas Wistar (Figura 23), hembras, de 150 a 174 g de peso y 9 a 11 semanas de edad procedentes de la empresa Harlan, con acceso *ad libitum* a pienso estándar y agua. Los ensayos fueron

aprobados y supervisados por el comité ético local de la Universidad de Granada.



Fig. 23 Ratas Wistar empleadas en el estudio

Para realizar los correspondientes tratamientos, las ratas se dividieron de manera aleatoria en los distintos grupos de estudio, formados cada uno por 4 animales.

3.5.1.2. Modelos de experimentación

Como se ha descrito previamente, las ratas se dividieron en cuatro grupos de 4 animales cada uno:

- *Grupo Testigo*: al cual no se le administró nada durante el estudio, pero estuvieron sometidas a las mismas condiciones de alimentación que el resto.
- *Grupo Cápsulas vacías*: a este grupo se le administraron únicamente las perlas, sin microorganismo inmovilizado.
- *Grupo Bacteria*: al cual se le administró una suspensión de la cepa probiótica en agua destilada.
- *Grupo Cápsulas + Bacteria*: grupo al cual le fueron administradas perlas de la cepa probiótica inmovilizada.

Un resumen de las características de los ensayos realizados se detalla en la tabla 29.

Tabla 29. Tabla resumen de los ensayos realizados en modelos murinos

	Estudios en función del tipo de perla	
	Xantano:Gelano	Jamilano:Gelano
Duración del ensayo	10 días	10 días
Cepa prebiótica	<i>L. plantarum</i> CRL 1815	<i>L. plantarum</i> CRL 1815
Polímeros empleados	1%Xantano+0.75%Gelano	1%Gelano+1%Jamilano
Muestras analizadas	Heces: días 1,3,7,10 Biopsia GI: día 11	Heces: días 1,3,7,10 Biopsias GI: día 11

3.5.1.3. Administración de las perlas y los microorganismos probióticos.

Tanto las perlas, con o sin probióticos, como la suspensión microbiana fueron administradas mediante cánula intraesofágica (50/15) a los animales, en cantidad igual a 100 μ L, diariamente durante diez días seguidos.

Para la administración del microorganismo probiótico se realizó una suspensión bacteriana en agua, consiguiendo una concentración final en el inóculo aproximada de 5×10^9 UFC/mL (previo tratamiento de viabilidad del inóculo según se ha descrito en el apartado 3.3.6), concentración igual a la de nuestro microorganismo encapsulado, todo ello determinado mediante recuento en placa antes del inicio del estudio. Las perlas, con o sin probiótico, se administraron directamente a los animales, sin suspensión previa.

La suspensión de probiótico empleada para la administración a los animales se usó también en la elaboración de las perlas (apartado 3.3.1). Asimismo, las mezclas de polímeros utilizadas para la formación de las perlas, tanto vacías como con probióticos, se procesaron en todo momento en las mismas condiciones (apartado 3.3.2.2).

3.5.1.4 Toma de muestras de animales de experimentación

A-Heces

La toma de muestra de las heces se realizó los días 1, 3, 7, 10 del estudio, aleatoriamente, de un mínimo de 2 animales del mismo grupo.

B-Biopsia

El día siguiente a la última dosis los animales se sacrificaron mediante rotura del diafragma tras haberlos anestesiado previamente por inhalación de éter. Los animales se fijaron sobre la tablilla de operaciones en posición de decúbito prono, se aseptizó la piel con etanol, y usando tijeras y pinzas de disección se cortó la piel de la cavidad abdominal.

Se tomaron biopsias de los 4 animales de cada grupo, del tracto gastrointestinal, para estudios de colonización microbiana, y del bazo, para la realización de ensayos de linfoproliferación.

3.5.1.5 Procesamiento de las muestras

A-Heces

Inmediatamente después de su recogida, las heces se introdujeron en jarras de anaerobiosis con sobres Anaerogen[®] (Oxoid) para conservar la muestra hasta su procesamiento, durante un tiempo máximo de 4 horas. Con las muestras de heces se realizó un homogeneizado en PBS estéril, en una proporción 1 en 10 (m/m). 1 mL de este homogeneizado fue procesado para su posterior análisis mediante FISH (fijación de la muestra) y almacenado a -20°C. El resto se almacenó a -80°C para su posterior estudio mediante PCR-TTGE.

B-Biopsias

Una vez extraído el bazo en condiciones estériles para su empleo en ensayos de linfoproliferación en respuesta a mitógenos, se procedió a la extracción del tracto gastrointestinal, en concreto, del intestino delgado proximal (Duodeno), el intestino delgado distal (Íleon) y el colon. Estas secciones, de 7 centímetros cada una, se mantuvieron en jarras de anaerobiosis hasta su procesamiento (máximo 4 horas).

Para el estudio de colonización, los órganos fueron lavados para eliminar el contenido intestinal con PBS estéril añadido de L-cisteína 0,05%, con la ayuda de una jeringa estéril de 5 mL, y posteriormente pesados en condiciones estériles antes de proceder a su almacenamiento a -80°C con el fin de preservarlos para su posterior estudio mediante PCR-TTGE.

3.5.2 Evaluación del impacto de la administración de *L.plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular sobre la microbiota fecal de las ratas.

Para evaluar el impacto y modulación de la microbiota fecal de las ratas que la administración del microorganismo inmovilizado puede ejercer se empleó como técnica la hibridación *in situ* fluorescente o FISH (Fluorescence *in situ* hybridization). Esta técnica permite la detección de grupos microbianos (géneros, e incluso especies, dependiendo de la sonda empleada) mediante la hibridación de sondas fluorescentes con determinadas secuencias del ADN bacteriano, previa fijación y permeabilización de las bacterias presentes en la muestra. La emisión de fluorescencia puede ser posteriormente detectada mediante microscopio de fluorescencia o citometría de flujo en función de la metodología empleada (McCartney, 2002).

3.5.2.1 Análisis mediante Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

A- Procesamiento de las muestras para el análisis

Las muestras fecales se recogieron de los animales e inmediatamente se prepararon para su fijación en paraformaldehído. Los homogeneizados se prepararon diluyendo las heces en PBS estéril en una proporción 1 en 10 (m/m). Alícuotas (500 μ L) de los homogeneizados fecales se centrifugaron a 13000 rpm, 5 min. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se lavaron con 1 mL de PBS estéril, centrifugando nuevamente a 13000 rpm, 5 min. Los sedimentos se resuspendieron en 375 μ L de PBS y se añadieron 3 volúmenes de paraformaldehído (Sigma) al 4% frío a la suspensión, se mezcló cuidadosamente y se llevó a incubar a 4°C durante 4 horas.

Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 13000 rpm, 2 min y se lavaron 2 veces en 1 mL de PBS filtrado frío. Las células se recogieron nuevamente por centrifugación a 13000 rpm, 2 min y los sobrenadantes se descartaron. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 150 μ L de PBS frío y después se añadió 150 μ L de etanol 96% frío. Las muestras así preparadas se almacenaron a -20°C hasta su transporte a la Universidad de Reading para su análisis.

B- Sondas empleadas en este estudio

Las sondas empleadas en este estudio y sus condiciones de utilización se recogen en la tabla 30. Todas las sondas se sintetizaron comercialmente (Sigma) y se marcaron con fluorescencia con cianina 3 (Cy3).

Tabla 30. Detalle de las sondas para FISH empleadas en esta tesis

Nombre	Detecta	Secuencia (5'→ 3')	Pre-tratamiento	Formamida (%) en tampón de hibridación	Temperatura (°C)		Referencia
					Hibridación	Lavado	
Ato291	<i>Cryptobacterium curtum</i> , <i>Gordonibacter pamelaeeae</i> , <i>Paraeggerthella hongkongensis</i> , all <i>Eggerthella</i> , <i>Collinsella</i> , <i>Olsenella</i> and <i>Atopobium</i> species	GGTCGGTCTCTCAACCC	Lisozima	0	50	50	(Harmsen, <i>et al.</i> , 2000)
Bif164	Most <i>Bifidobacterium</i> species and <i>Parascardovia denticolens</i>	CATCCGGCATTACCACCC	Lisozima	0	50	50	(Langendijk, <i>et al.</i> , 1995)
Chis150	Most members of <i>Clostridium</i> cluster I, all members of <i>Clostridium</i> cluster II	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	No	0	50	50	(Franks, <i>et al.</i> , 1998)
Clit135	Nine members of <i>Clostridium</i> cluster XI	GTTATCCGTGTGTACAGGG	No	0	50	50	(Franks <i>et al.</i> , 1998)
Ecy1387	<i>Clostridium innocuum</i> , <i>Eubacterium biforme</i> , <i>Eubacterium cylindroides</i> , <i>Eubacterium dolichum</i> , <i>Eubacterium tortuosum</i> , <i>Streptococcus pleomorphus</i>	CGCGGCATTGCTCGTTCA	No	20	50	50	(Harmsen, <i>et al.</i> , 2002)
Erec482	Most members of <i>Clostridium</i> cluster XIVa	GCTTCTTAGTCARGTACCG	No	0	50	50	(Franks <i>et al.</i> , 1998)
Eub338‡	Most <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCCTAGGAGT					
Eub338II‡	<i>Planctomycetales</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Lisozima	35	46	48	(Daims, <i>et al.</i> , 1999)
Eub338III‡	<i>Verrucomicrobiales</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT					
Fpra655	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> and some <i>Subdoligranulum</i> species		No	0	58	58	(Hold, <i>et al.</i> , 2003)
Lab158	All <i>Oenococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Melissococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Catelicoccus</i> , <i>Paralactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> and <i>Lactococcus</i> species, most <i>Lactobacillus</i> , <i>Weissella</i> and <i>Leuconostoc</i> species	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	Lisozima		50	50	(Harmsen, <i>et al.</i> , 1999)
Prop853	Most members of <i>Clostridium</i> cluster IX	ATTGCGTAACTCCGGCAC	No	0	50	50	(Walker, <i>et al.</i> , 2005)
Rbro730§	<i>Anaerotruncus colihominis</i> , <i>Ruminococcus bromii</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> ,	TAAAGCCCAGYAGGCCGC					
Rfla729§	<i>Ruminococcus albus</i> , <i>Desulfotomaculum alcoholivorax</i>	AAAGCCCAGTAAGCCGCC	Lisozima	20	50	50	(Harmsen <i>et al.</i> , 2002)

‡Las 3 sondas se emplearon juntas a concentraciones equimolares (50 ng/μl).

§Ambas sondas se emplearon juntas a concentraciones equimolares (50 ng/μl).

C- Hibridación de las sondas a las muestras

La hibridación se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Martin-Pelaez, *et al.* (2008). Brevemente, para la realización de las hibridaciones, se añadieron 20 μL de cada muestra en cada uno de los pocillos (10 mm de diámetro) de un portaobjetos de 6 pocillos recubiertos de Teflón y poli-L-lisina (Tekdon Inc).

Las muestras se secaron en los portaobjetos a 46°C, 15 min y, posteriormente, se deshidrataron siguiendo una serie de soluciones de alcohol (50%, 80% y 96%, 3 min en cada uno), dejando que el etanol se evaporara completamente de las muestras antes de la adición de las sondas. Con el fin de permeabilizar las células para las sondas Lab158, Bif164, Ato291, Rfla729/Rbro730 y Eub338, las muestras se trataron con 20 μL de Lisozima (1 mg/mL en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) a 37°C, 15min antes de lavarlas brevemente en agua destilada (2-3 s) y someterlas al gradiente de etanol.

Una mezcla de la sonda con el tampón de hibridación (Tabla 31) (5 μL de un stock de 50 ng/ μL de sonda junto con 45 μL de tampón de hibridación) se aplicó a la superficie de cada pocillo. La hibridación se llevó a cabo durante 4 horas en un horno ISO20 (Grant Boekel).

Tabla 31. Tampones de hibridación empleados en este estudio según las exigencias de hibridación

Componentes (V= μL)	Concentración de formamida (%)		
	0	20	35
5 M NaCl	180	180	180
1 M Tris/HCl (pH 8,0)	20	20	20
Formamida	0	200	350
H ₂ O destilada	799	599	449
10 % sodium dodecyl sulfate	1	1	1
Volumen final (mL)	1	1	1

Para realizar el lavado, los portaobjetos se depositaron en 50 mL de tampón de lavado (Tabla 32) conteniendo 20 μL de 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI; 50 ng/ μL , Sigma) durante 15min. Posteriormente se realizó un rápido lavado (2-3 s) en agua fría mantenida en hielo y se secaron los portaobjetos bajo un chorro de aire comprimido. Se añadieron 5 μL de “antifade” o reactivo para evitar la pérdida de fluorescencia (ProLong® Gold

antifade reagent, Invitrogen) a cada pocillo y se aplicó un cubreobjetos sobre el portaobjetos. Los portaobjetos así preparados se almacenaron protegidos de la luz a 4°C hasta su análisis por microscopía de fluorescencia (3 meses máximo).

Tabla 32. Tampones de lavado empleados en este estudio según las exigencias de hibridación

Componentes (V=mL)	Concentración de formamida (%)		
	0	20	35
5 M NaCl	9,00	2,15	0,70
1 M Tris/HCl (pH 8,0)	1	1	1
0,5 M EDTA (pH 8,0)	0	0,5	0,5
H ₂ O destilada	40	46,35	47,8
Volumen final (mL)	50	50	50

D- Cuantificación de bacterias

Las muestras contenidas en los portaobjetos se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon E400 Eclipse utilizando el filtro DM575 (Figura 24). Las células se contaron en 15 campos de visión y el número de bacterias por g de heces se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$DF \times ACC \times 6732,42 \times 50 \times DF_{\text{muestra}}$$

Dónde: **DF** (Factor de dilución) se calculó teniendo en cuenta la concentración de la muestra original [(300 µL/500 µL)×10 para expresar los recuentos por gramo de muestra). **ACC** (Media del recuento de células) se determinó mediante el recuento bacteriano en 15 campos de visión, asumiendo que se observó una distribución normal en los recuentos. El valor **6732,42** se refiere al área del pocillo dividido por el área del campo de visión. **DF_{muestra}** alude a la dilución de la muestra empleada para cada sonda en particular (p.ej. 10x para los recuentos de Lab158).



Fig. 24 Microscopio de fluorescencia Nikon E400 Eclipse

3.5.3 Estudios de colonización y tránsito intestinal de *L.plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular.

Estos estudios se llevaron a cabo mediante técnicas de análisis de comunidades, en concreto TTGE. Las técnicas de extracción de ácidos nucleicos, amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y TTGE se detallan a continuación.

3.5.3.1 Extracción de ADN

La obtención de material genético es el punto de partida para los posteriores estudios de comunidades mediante TTGE. Se obtuvo material genético tanto de las heces como de las biopsias obtenidas de los animales de experimentación.

A-Heces

El método empleado para la extracción de ADN de heces se basa en el descrito por Godon, *et al.* (1997) modificado como se describe a continuación. En detalle, una vez descongeladas las muestras fecales se tomaron 2 mL del homogeneizado (equivalentes a 200 mg de heces) y se centrifugaron a 14000 rpm, 20min para concentrar la muestra. El sedimento resultante se homogeneizó cuidadosamente con 250 μ L de Tiocianato de guanidina 4 M

(Sigma), 40 μL de N-Lauroil sarcosina al 10% y 500 μL de N-Lauroil sarcosina al 5% y se llevó a incubar a 70°C durante 1 hora.

Tras la incubación, el homogeneizado se transfirió a un tubo de 2 mL conteniendo 750 μL de bolas de sílica de 0,1 mm de diámetro (Biospec Products) previamente esterilizado y se agitó a velocidad media durante 2min en un Mini Bead-Beater (Biospec Products). Se realizaron 2 ciclos de agitación tras cada uno de los cuales se dejaron reposar las muestras en hielo durante 5min para evitar la acción de posibles nucleasas.

Quince mg de polivinilpirrolidona (Sigma) se añadieron a cada muestra agitando para homogeneizar la mezcla previo a su centrifugación durante 3min a 14000 rpm. Tras la recogida del sobrenadante, el sedimento se lavó con 500 μL de TENP (50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1% (m/v) polivinilpirrolidona), se centrifugó a 14000 rpm, 3min y el nuevo sobrenadante se añadió al primero. Este paso de lavado se repitió 3 veces. El "pool" de sobrenadantes (alrededor de 2 mL) se centrifugó 1min a 15000 rpm y se separó en 2 tubos.

Los ácidos nucleicos se precipitaron durante 10min a temperatura ambiente por la adición de 1 volumen de isopropanol (Sigma) y mezcla por inversión y se recogieron mediante centrifugación a 14000 rpm, 5min. Los sedimentos se resuspendieron en 225 μL de Tampón fosfato 0,1 M, pH 8 y 25 μL de acetato potásico 5 M y se volvieron a reunir en un tubo antes de dejarlos en hielo durante un mínimo de 90 min para la precipitación de las proteínas. El sobrenadante resultante de centrifugar 30min a 14000 rpm se transfirió a un nuevo tubo, al cual se le añadió 2 μL de RNasa (10 mg/mL en agua estéril milliQ; Sigma), y se incubó a 37°C durante 30 min

El ADN se precipitó mediante la adición de 50 μL de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y 1 mL de etanol absoluto conservado a -20°C. El tubo se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente y el ADN se recogió mediante centrifugación a 14000 rpm durante 15 min. El sedimento final de ADN se lavó con etanol 70% frío, se dejó secar mediante evaporación y se resuspendió en 200 μL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM).

B-Órganos

Para la extracción del ADN bacteriano que pudieran contener los órganos adheridos a sus paredes, se siguió el mismo protocolo empleado para las heces con algunas modificaciones para aumentar su eficacia (Lepage, *et al.*, 2005). En primer lugar, previo a la extracción, los órganos se dejaron una noche a 56°C y 300 rpm en un tampón de lisis (Tissue lysis, Qiagen) en proporción 1:10 (m/V), para disgregarlos mediante agitación con vórtex o micropipeta de 1000 µL, en caso de que fuera necesario. El homogeneizado de órgano se centrifugó a 14000 rpm, 30 min y con el sedimento resultante se procedió a la extracción del ADN.

Los ácidos nucleicos, en este caso, se precipitaron con isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación de 15 min en hielo y centrifugación a 15000 rpm, 30 min a 4°C. Los sedimentos se resuspendieron en 112 µL de tampón fosfato 0,1 M, pH 8 y 12 µL de acetato potásico 5 M. Tras el tratamiento con la RNasa, para la precipitación del ADN se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de 10 min en hielo y se recogió mediante centrifugación a 15000 rpm durante 30 min a 4°C. El sedimento final de ADN se resuspendió en 30 a 100 µL de tampón TE.

C-Cultivos puros

Para la extracción del ADN genómico se partió de 500 µL de masa bacteriana concentrada (procedentes de 200 mL de cultivo) añadidos a 250 µL de bolas de sílica de 0,1 mm de diámetro estériles y hasta 1 mL de TE. Se añadió dodecil sulfato sódico o SDS al 25% hasta conseguir una concentración de 0,25% y así ayudar a la lisis bacteriana. El tubo se agitó a velocidad media durante 2 min en un Mini Bead-Beater (Biospec Products) e inmediatamente después se mantuvieron 5 min en agua-hielo para inactivar las enzimas liberadas.

Se centrifugó el tubo y se transvasó el sobrenadante a otro tubo. El ADN se precipitó incubando 10 min a temperatura ambiente con la adición de 0,1 volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 volumen de isopropanol y mezcla por inversión. Se recogió el ADN por centrifugación a 14000 rpm, 15 min y se

secó. Posteriormente se resuspendió en unos 500 μL de TE. Dos μL de RNasa (10 mg/mL en agua milliQ estéril) y 10 μL de Proteinasa K (10 mg/mL en agua milliQ estéril; Sigma) se adicionaron a la suspensión y se incubó durante 1 hora a 37°C.

La precipitación final de ADN se realizó incubando a -20°C durante 1 hora tras la adición de 50 μL de acetato sódico 3 M, pH 5,2 y 1 mL de etanol absoluto. El precipitado se recogió por centrifugación a 14000 rpm, 15 min, se lavó con etanol 70% y se secó para finalmente resuspenderlo en 500 μL de TE.

3.5.3.2 Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica por la cual se pueden amplificar exponencialmente determinados fragmentos de ADN. Para ello, tras la desnaturalización de la doble hebra de ADN, la acción de una ADN polimerasa termoestable (Taq-polimerasa) permite la síntesis de las hebras complementarias a partir de 2 cebadores. La amplificación tiene lugar en 3 etapas: la *desnaturalización*, separación de las 2 hebras de ADN por ruptura de los puentes de hidrógeno; el *anillamiento*, apareamiento específico de los cebadores a cada lado de la secuencia diana; y la *elongación*, en donde la polimerasa permite la síntesis de un ADN complementario a cada una de las hebras a partir de cada cebador.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Todos los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 33 fueron cebadores universales dentro del dominio bacteria.

Tabla 33. Oligonucleótidos empleados en esta tesis

Uso	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia	
Amplificación	16F27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(Lane, 1991)	
	<i>rRNA16s</i>	16R1525		5'-AAGGAGGTGWTCCARCC
Secuenciación	357-F	5'-CTCCTACGGGAGGCAGCA	(Fox, <i>et al.</i> , 1992)	
	<i>rRNA16s</i>	519-R		5'-GWATTACCGCGGCKGCTG
		945-F		5'-GGGCCCGCACAAAGCGGTGG
TTGE V6-V8	U968-GC-F	5'-*AACGCGAAGAACCTTAC	(Lepage, <i>et al.</i> , 2005)	
	<i>rRNA16s</i>	L1401-R		5'-GCGTGTGTACAAGACCC

*Cola GC de 40 pares de bases

La composición general de la mezcla de amplificación, en la cual se empleó la Hot StarTaq Polimerasa (QIAGEN), fue la siguiente (Tabla 34):

Tabla 34. Composición de la mezcla de amplificación

Compuesto	Concentración
PCR buffer (Qiagen)	1x
Mg (OAc) ₂ (Roche)	1,5 mM
Cebador "forward"	0,5 µM
Cebador "reverse"	0,5 µM
dNTP's (Qiagen)	0,1 mM cada uno
Hot StarTaq polimerasa (Qiagen)	2,5 U
Volumen final	25 µL

Se realizaron varias diluciones del ADN molde (1 y 1,5 µL del extracto original o 1 µL de una dilución 1/10 del mismo), ya que se sospechó la presencia de inhibidores, y las diluciones con mayor número de PCR positivas se emplearon para los siguientes análisis. En cada serie de reacción se introdujeron controles negativos (sin ADN). Las condiciones de amplificación empleadas en esta tesis se detallan en la tabla 35:

Tabla 35. Condiciones de amplificación empleadas en esta tesis

Objetivo	Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Gen rRNA16s <i>Amplificación 1500pb</i>	Pre-desnaturalización	1	95°C	15 min
	Desnaturalización		94 °C	1 min
	Anillamiento-cebadores	30	55 °C	1 min
	Elongación		72 °C	1,30 min
	Post-elongación	1	72 °C	7 min
	Conservación	∞	4 °C	∞
Objetivo	Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
TTGE V6-V8 <i>Amplificación 450pb</i>	Pre-desnaturalización	1	95°C	15 min
	Desnaturalización		97 °C	1 min
	Anillamiento-cebadores	30	58 °C	1 min
	Elongación		72 °C	1,30 min
	Post-elongación	1	72 °C	15 min
	Conservación	∞	4 °C	∞

3.5.3.3 Control de calidad y cantidad de ADN

La visualización para la comprobación de la calidad del ADN genómico y de los productos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (Bio Rad) preparados a distinta concentración (0,8-2%) en Tris–Acetato–EDTA 1x (TAE; 40 mM Tris-HCl, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8,3), según el tamaño del ADN a resolver. Dichos geles se prepararon añadiendo 2,5 µL de una solución de bromuro de etidio 10 mg/mL (Bio Rad) por cada 50 mL de gel de agarosa. Como tampón de electroforesis se empleó el TAE 1x, preparado a partir de TAE 50x (Bio Rad).

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V durante 30 min y una vez transcurrido este tiempo los geles se visualizaron en un transiluminador Vilber-Loumart Quantum ST4, por exposición a luz ultravioleta (302 nm).

La cuantificación del ADN genómico y de los productos de PCR obtenidos se realizó de manera relativa respecto a un patrón, para lo cual se incorporaron al gel marcadores de distinto tamaño en función de la muestra cargada. Para la cuantificación de ADN genómico se incorporó en marcador

DNA Molecular Weight Marker II (Roche) de 0,12-23,1 kpb, mientras para que para productos de PCR se utilizó como marcador el AmpliSize™ Molecular Ruler (Bio Rad) de 50 a 2000 pb (Figura 25).

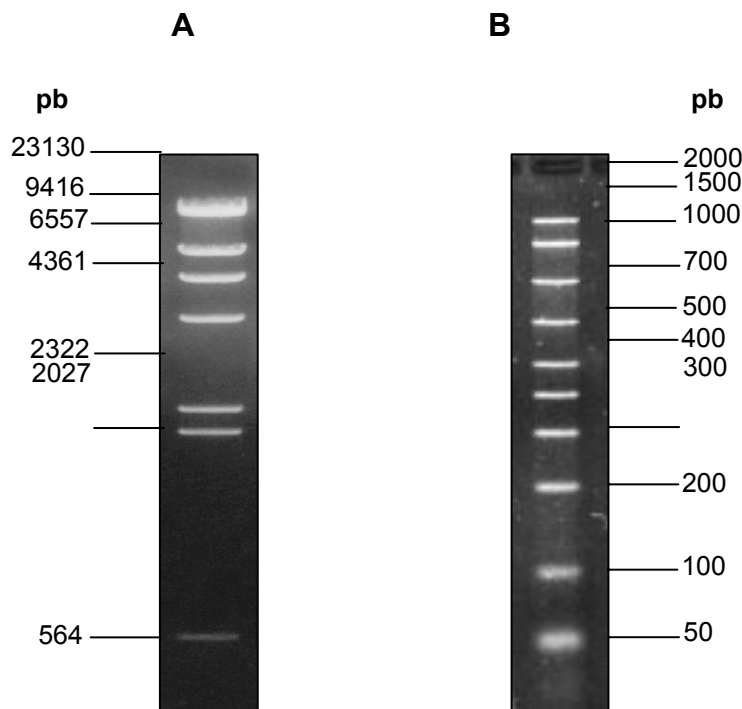


Fig. 25 Marcadores de peso molecular empleados. A. DNA Molecular Weight Marker II; B. AmpliSize™ Molecular Ruler

3.5.3.4 Técnica de análisis de comunidades: TTGE

La electroforesis desnaturizante en gradiente temporal de temperatura o TTGE (Temporal Temperature-gradient Gel Electrophoresis) consiste en una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes con una elevación progresiva y constante de la temperatura. Esta técnica de separación se basa en la diferencia de temperatura de fusión del ADN (T_m). La T_m de una secuencia de ADN va a depender de su contenido en guanidina y citosina, por estar estas 2 bases unidas por 3 puentes de hidrógeno frente a 2 de la timidina con la adenosina. De esta manera, por esta propiedad, se van a poder separar gradualmente moléculas de ADN con distinta secuencia, y por tanto distinta T_m , en un gradiente desnaturizante. Cuando el punto de fusión se alcanza, la doble hebra se separa parcialmente creando una molécula ramificada con movilidad reducida en el gel de poliacrilamida, produciéndose el anclaje.

El ambiente desnaturalizante se crea mediante una concentración elevada de urea (6-8 M) y un gradiente creciente de temperatura. La separación total de las hebras se evita mediante una cola GC que se acopla al extremo del oligonucleótido usado en la reacción de PCR, el cual ancla el fragmento desnaturalizado al gel. Si los fragmentos obtenidos en la reacción de PCR tienen una secuencia rica en GC, la desnaturalización será más costosa y por lo tanto avanzarán más trayecto en la electroforesis hasta que se produzca la desnaturalización completa y se queden anclados en el gel. La posición final, por tanto, va a depender de numerosas variables: tamaño, secuencia nucleotídica, tiempo de electroforesis, concentración de urea, concentración de acrilamida, concentración de TAE, rango de temperatura de electroforesis, rampa de incremento de temperatura de electroforesis y voltaje de electroforesis. Así, en principio es posible diferenciar amplicones que poseen un solo nucleótido de diferencia en su secuencia.

La TTGE se realizó en un sistema Dcode Universal Mutation Detection System (Bio Rad) (Figura 26). Las reacciones de PCR para su procesamiento mediante TTGE se hicieron tanto sobre ADN procedente de cultivo puro como de heces y órganos, amplificando con la pareja de cebadores U968-GC-F/L1401-R.



Fig. 26 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio Rad)

A-Preparación de los geles de acrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida de 16 cm x 16 cm de 1 mm de grosor vertiendo la poliacrilamida en un “sándwich” formado con los cristales. Los geles empleados para resolver los fragmentos de PCR se prepararon con una composición de 8% (m/v) de acrilamida/bis-acrilamida, 7 M de urea y 1,25x de TAE y se polimerizaron con N,N,N',N'-Tetrametil-etilen-diamina (TEMED; Bio Rad) y Persulfato amónico (APS; Sigma; preparado al 10% en agua milliQ estéril) (Tabla 36).

Tabla 36. Composición para la preparación de 2 geles de poliacrilamida

Compuesto	Cantidad
TAE 50x (Bio Rad)	1,75 mL
40% Acrilamida/Bis (37,5:1) (Bio Rad)	14 mL
Urea (Fluka)	29,4 g
TEMED (Bio Rad)	60 µL
10% APS (Sigma)	600 µL
Volumen final	70 mL

B-Electroforesis

El proceso de electroforesis se llevó a cabo en 7 L de tampón 1,25 x TAE. Tras cargar las muestras en el gel en proporción 1:1 con el tampón de carga (70% glicerol; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% xilencianol; 2 mM EDTA), se fijó un voltaje de 20 V durante 20 min para alinear las muestras y mejorar la resolución. La electroforesis se llevó a cabo según las condiciones descritas por Lepage, *et al.* (2005): se partió de una temperatura inicial de 66°C hasta alcanzar una temperatura final de 70,5°C con una rampa de 0,2°C/h, para ello se corrió el gel durante 22 horas a un amperaje constante de 64 mA.

C-Tinción de los geles

La tinción de los geles para su revelado se hizo con SYBER Green I (nucleic acid gel stain, Roche), sumergiendo un gel en una solución preparada con 25 µL de SYBER Green I y 250 mL de 1,25 x TAE durante 30 min y, a

continuación, en 250 mL de 1,25 x TAE durante 30 min para su lavado. Los geles así teñidos se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador Vilber-Loumart Quantum ST4, donde se tomaron fotografías que se almacenaron en formato TIFF para su posterior análisis.

D-Escisión de bandas de los geles

Las bandas predominantes así como aquellas que se encontraban al mismo nivel que *L.plantarum* CRL 1815 se escindieron del gel con la ayuda de puntas de micropipeta de 200 µL estériles. Los fragmentos de gel escindidos se lavaron con 200 µL de agua milliQ estéril y se dejaron posteriormente eluir en 100 µL de agua milliQ estéril a 4°C durante una noche.

En función de la intensidad de la banda de origen, de 3 a 5 µL de ADN eluído se reamplificaron con los mismos cebadores y condiciones empleados para TTGE V6-V8 descritos en el apartado 3.5.3.2. La calidad de los productos reamplificados se comprobó sometiendo estos productos nuevamente a TTGE. Los productos reamplificados se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación de ADN-Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Granada (apartado 3.5.3.5).

E-Análisis de los geles

Los perfiles de TTGE se compararon empleando el programa informático Quantity One[®] versión 4.6.3 (Bio Rad). Para el análisis se tuvo en cuenta el número de bandas, su posición en el gel y su intensidad. Para compensar las diferencias entre los geles o bien las distorsiones que se pueden originar durante el proceso de electroforesis, los geles se alinearon y normalizaron mediante un patrón de referencia externo (AmpliSize[™] Molecular Ruler (Bio Rad). Los índices de similitud entre los distintos perfiles se calcularon mediante el coeficiente de Dice y se construyeron los correspondientes dendogramas empleando como método de agrupamiento el Neighbour-Joining.

3.5.3.5 Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de ADN-Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Granada.

A- Secuenciación del gen 16srRNA

La secuenciación del gen 16srRNA previa amplificación con la pareja de cebadores específicos 16F27/16R1525 se realizó tras la purificación de los productos de 1500 pb obtenidos con Amicon Ultra-0.5, Ultracel-100 Membrane, 100 kDa (Millipore). Los productos purificados se secuenciaron directamente con los cebadores 357-F/519-R/945-F en un secuenciador Applied Biosystems 373A DNA siguiendo el protocolo del fabricante para Taq ciclosecuenciación con dideoxynucleotidos marcados con fluorescencia (Sanger, *et al.*, 1977).

B- Secuenciación de las bandas específicas producto de la escisión de los geles de poliacrilamida

La secuenciación de los productos de PCR resultantes de la re-amplificación del ADN eluído de las bandas de los geles de la TTGE se realizó siguiendo el mismo procedimiento de concentración y purificación de ADN y secuenciación que para el gen 16srRNA, difiriendo únicamente en los cebadores empleados en la secuenciación. En este caso todos los productos se secuenciaron tanto con el cebador directo (U968-GC-F) como con el inverso (L1401-R).

C- Análisis de secuencias

Las secuencias recibidas del Servicio de Secuenciación de ADN-Genómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Granada, se examinaron y se analizó su calidad con el software Chromas lite versión 2.01.

Posteriormente, todas las secuencias obtenidas fueron analizadas en la base de datos del NCBI con la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), cuyos resultados de similitud entre secuencias se basan en alineamientos de secuencias de tipo local (Altschul, *et al.*, 1997).

El análisis filogenético se llevó a cabo con la aplicación MEGA versión 5 (Kumar, *et al.*, 2004), realizando alineamientos mediante Clustal W (Thompson, *et al.*, 1994) y los árboles filogenéticos mediante el agrupamiento con el método Neighbour-Joining.

3.5.4 Evaluación de la respuesta biológica derivada de la administración de perlas de *L.plantarum* CRL 1815.

3.5.4.1 Linfoproliferación en respuesta a mitógenos

Este estudio fue realizado gracias a una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Ruiz-Bravo, de nuestro Departamento de Microbiología, de acuerdo con el procedimiento puesto a punto por este grupo (Ruiz-Bravo, *et al.*, 2001).

A-Medios de cultivo

El medio empleado para el cultivo de células fue el RPMI 1640 completo. Su composición se muestra en las tablas 37 y 38:

Tabla 37. Composición del medio RPMI 1640 completo

Compuesto	Cantidad
RPMI 1640 sin glutamina y con bicarbonato sódico (Sigma)	100 mL
Suero Fetal de Ternera o FCS (Seralab)*	10 mL
Mezcla de antibiotico-antimicótico (Sigma)	10 mL
L-glutamina (Sigma)	1 mL
Piruvato sódico(Sigma)	1 mL
2-Mercaptoetanol (Merck)	0,35 µL

*El FCS se calentó previamente 30 min a 56°C para desactivar el complemento

Tabla 38. Concentración de la suplementación del medio RPMI 1640 completo

Compuesto	Concentración inicial	Concentración final [†]
L-glutamina	200 mM	2 mM
Piruvato sódico	100 mM	1 mM
Penicilina*	10 ⁴ U.I.	10 ² U.I.
Estreptomicina*	10 mg	10 ² U.I.
Anfotericina B*	25 µg	10 ² U.I.

*Solución comercial que contiene los 3 antibióticos (Sigma)

[†]Concentración final en 100 mL de medio

Los medios, preparados en campana de flujo laminar, se esterilizaron por filtración a través de membranas millipore de 0,22 µm, con ayuda de una bomba (Millipore) que suministró presión positiva. La esterilidad de la solución se comprobó manteniendo el medio a temperatura ambiente durante 24 h, comprobando la ausencia tanto de elementos sólidos como de algún indicio de turbidez, que pudiera indicar el crecimiento de bacterias u hongos, siendo así descartado para su utilización. Una vez asegurada la validez del medio se guardó en nevera a 4 °C un periodo no superior a 10 días, dado que la glutamina sufre un proceso de auto-hidrólisis espontánea, disminuyendo su concentración progresivamente. Momentos antes de su utilización se llevó a temperatura ambiente.

B-Obtención de suspensiones de esplenocitos

Una vez los animales fueron sacrificados como se describió en el apartado 3.5.1.3.B, se colocaron en una superficie plana, inmovilizaron y aseptizaron mediante baño con etanol, siempre trabajando en cabina de flujo laminar para garantizar la esterilidad del proceso. Se realizaron diversas incisiones en la piel, apartándola, y se llevó a cabo la histerectomía, tras la cual el bazo se depositó sobre una rejilla metálica estéril, contenida en una placa petri con 10 mL de medio de cultivo de células, en donde se homogenizó mediante presión con la parte roma de una jeringa de 5 mL estéril. Los sedimentos tisulares se dejaron decantar y se separó la suspensión, con la ayuda de una pipeta estéril, que se centrifugó a 1100 rpm, 10 min a 4°C para sedimentar las células. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 5 mL de tampón de lisis de hematíes (Sigma) y, tras 10 min a temperatura ambiente, se adicionaron 5 mL de medio de cultivo para proteger a las células nucleadas del daño hipotónico. Finalmente se realizaron dos nuevos lavados por centrifugación siguiendo las condiciones previamente descritas y se resuspendió el sedimento en medio de cultivo celular.

C-Recuento de células viables y ajuste de la suspensión.

Cien microlitros de la suspensión de esplenocitos se llevaron a un tubo de 1,5 mL conteniendo 500 μ L de azul tripán (Sigma) diluido 1:10 en solución salina y 400 μ L de medio de cultivo. Cantidad suficiente de esta dilución 1:10 de esplenocitos, bien homogeneizada, se llevó a una cámara hemocitométrica de Neubauer para el recuento de células viables (identificadas por su capacidad para excluir el colorante azul). La viabilidad de dichas suspensiones ha de ser superior al 95%.

La suspensión original se centrifugó a las condiciones ya descritas y el sedimento células se resuspendió en volumen adecuado de medio de cultivo para que la concentración final de la suspensión fuera de 5×10^6 células viables/mL.

D-Cultivo de esplenocitos

Las células se cultivaron en placas microtiter de poliestireno de fondo plano (Costar). Se distribuyeron 100 μL de suspensión celular por pocillo, de modo que cada pocillo recibió 5×10^5 células. Cada suspensión procedente de un ratón se distribuyó a lo largo de una columna de 8 pocillos. La primera columna solo recibió células y se utilizó como blanco. El resto de las columnas recibieron células así como diferentes agentes mitogénicos a razón de 10 μL por pocillo. Se ensayaron 2 tipos de agentes mitogénicos, LPS (lipopolisacárido; mitógeno estándar de células B) y Concanavalina A (Con A, mitógeno estándar de células T).

LPS-Se utilizó LPS de *Salmonella typhi* (Sigma) en una concentración final en el cultivo de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Del reactivo comercial liofilizado estéril se preparó una disolución madre, disolviendo 1 mg del líofilo en 5 mL de medio RPMI 1640 sin suplementar (concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que una vez homogeneizada fue esterilizada por filtración (0,22 μm) y repartida en alícuotas en criotubos para su almacenamiento a -20°C . En el momento de su uso se diluyó esta suspensión a 1:8 para finalmente añadir 10 μL de esta disolución a cada pocillo.

Concanavalina A-La Con A (Sigma) se utilizó a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Del reactivo comercial liofilizado estéril se disolvieron 5 mg en 5 mL de medio RPMI 1640 sin suplementar. Esta solución madre, una vez esterilizada por filtración (0,22 μm), se repartió en alícuotas que se conservaron a -20°C . En el momento de su utilización, se tomaron 0,1 mL de ConA y se le añadieron 9,9 mL de medio de cultivo RPMI sin suplementar. Cada pocillo de la placa recibió 10 μL de esta solución para obtener la concentración final deseada.

Las placas así preparadas se cultivaron a 37°C , 5% tensión de CO_2 y humedad a saturación durante 72 horas, tras lo cual se procedió a la lectura de las mismas.

E-Medida de la linfoproliferación

La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico descrito por Mosmann (1983). Tras 3 días de incubación, las placas se llevaron a una campana de flujo laminar donde se adicionó a cada pocillo 10 μ L de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, compuesto conocido como MTT (Sigma), al 0,5 % en PBS. Se trata de un reactivo extemporáneo que debe prepararse inmediatamente antes de su uso. La solución de MTT se esterilizó por filtración (0,22 μ m) y se mantuvo a 4°C protegida de la luz.

Las placas se incubaron a las condiciones descritas anteriormente durante 4 horas, período en el cual las células metabólicamente activas redujeron el MTT hacia un compuesto coloreado. Tras la incubación, a cada pocillo se le adicionó 200 μ L de isopropanol ácido (0,42 mL de HCl al 35% por cada 100 mL de isopropanol) con el fin de extraer de las células el colorante reducido. Dicho colorante, en forma de cristales, fue solubilizado completamente por agitación con micropipeta. La densidad óptica de los cultivos se determinó en un lector microELISA (Behring EL 311), previamente programado para medir a doble longitud de onda 570 nm y 630 nm. Para cultivos de bazo, cada placa poseía un blanco, siendo por norma la primera columna, compuesta por ocho pocillos a los cuales no se les adicionó ningún agente estimulante. Los resultados se expresaron como la media aritmética de las densidades ópticas de los ocho pocillos de cada columna destinada a un determinado mitógeno.

3.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la validación del procedimiento de inmovilización así como en los ensayos de supervivencia microbiana (conservación en el tiempo y estudios *in vitro*) se estudiaron, desde un punto de vista estadístico, mediante la realización de un análisis de varianza (ANOVA), utilizando un nivel de significación < 0,05 para el rechazo de la hipótesis de

igualdad de medias. Si tras este análisis se detectaron diferencias significativas en las medias poblacionales comparadas, se realizó un test de múltiples comparaciones en donde las diferencias fueron cuantificadas por la estimación de la diferencia de medias (error estándar). Las gráficas se realizaron empleando el programa S-plus.

La significación estadística de la diferencia entre los grupos de medidas de los estudios *in vivo* así como de los resultados obtenidos del estudio de las propiedades probióticas, se determinó mediante la realización de un análisis de varianza (ANOVA) de un factor utilizando un nivel de significación $< 0,05$ para el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias. Si tras este análisis se detectaron diferencias significativas en las medias poblacionales comparadas, se realizó la prueba de la *t* de Student, en donde los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Encapsulación de microorganismos probióticos

4.1.1 Empleo de polímeros microbianos para la formación de perlas.

4.1.1.1 Selección de las mezclas de polímeros para la inmovilización microbiana mediante el método de goteo.

Los polímeros microbianos gelano, xantano, pululano y jambilano se probaron individualmente para la producción de perlas mediante el método de goteo en un rango de concentraciones del 0,5% al 2%. De todos estos polímeros, solamente el gelano fue capaz de producir perlas con forma (esférica o esfera imperfecta) y consistencia adecuada, al contrario que los polímeros microbianos restantes, que no mostraron una gelificación adecuada en forma de perlas aplicando esta metodología.

A pesar de ser el gelano un polímero apto para la obtención de perlas, se emplearon concentraciones elevadas, mayores de un 1%, para obtenerlas. El gelano gelifica principalmente por la acción de cationes (p.ej. iones Ca^{2+} de la solución de CaCl_2) pero a temperaturas bajas se encuentra en forma de gel sólido. Esta gelificación con la temperatura va a estar directamente asociada a la concentración de gelano que se emplea, de tal manera que a las concentraciones a las que es capaz de formar perlas, se necesitará una temperatura elevada (mayor de 60°C) para que no gelifique (Camelin, *et al.*, 1993) y que en estas condiciones se pueda añadir el concentrado probiótico antes de la formación de las perlas.

Para evitar estos inconvenientes, que pueden afectar a la supervivencia microbiana durante el proceso, se realizaron mezclas de gelano con los otros polímeros (xantano, pululano y jambilano) con el propósito de intentar disminuir la temperatura de gelificación y facilitar la manipulación de los polímeros durante la inmovilización. Así, un rango de concentraciones de gelano (0,5%-2%) se combinó con un rango de concentraciones de los restantes polímeros microbianos (0,2%-1,5%).

Las mezclas de gelano con pululano fueron incapaces de formar perlas, ya que al caer la gota de polímero a la solución de recogida de cloruro cálcico se formaban medias esferas (Figura 27). Por ello se descartó esta mezcla polimérica para la encapsulación de probióticos. No obstante, las mezclas de gelano con xantano y con jamilano demostraron ser capaces de formar perlas mediante la metodología ensayada. De esta manera se seleccionaron las mejores mezclas de polímeros para la formación de perlas e inmovilización microbiana a partir de las últimas mezclas poliméricas, atendiendo a la forma redondeada, la calidad y el menor diámetro de las perlas obtenidas.



Fig. 27 Medias perlas formadas con las mezclas de pululano y gelano (1x).

Todos los polímeros ensayados solo fueron capaces de formar esferas imperfectas con el método de goteo empleado, de este modo, se seleccionaron las perlas con la forma más esférica. Así, de acuerdo con estos resultados y con el menor diámetro de las perlas, las mezclas que se seleccionaron para la encapsulación microbiana fueron: **1% Gelano con 1% Jamilano** y **0,75% Gelano con 1% Xantano**.

4.1.1.2 Obtención de cápsulas aplicando el generador electrostático de goteo y caracterización de las perlas.

Aunque se eligió inicialmente el método de goteo por ser una metodología menos laboriosa y más práctica que las técnicas de emulsión, en términos generales genera perlas de 2-4 mm de diámetro (Muthukumarasamy, *et al.*, 2006), lo que hace deseable una reducción de su tamaño, dado que el objetivo final es incluir los probióticos en alimentos, en los que el tamaño de las

perlas debe ser muy pequeño. Para ello se propuso el empleo de otra metodología de inmovilización por goteo, la del *generador electrostático de goteo*. Esta técnica ha demostrado ser eficaz para la producción de perlas de polímeros con alginato de pequeño tamaño (inferior a 2 mm e incluso de micras) e inocua para varios tipos de células como la levadura de cerveza o células de plantas (Manojlovic, *et al.*, 2006).

Las perlas que se prepararon inicialmente mediante el método de goteo con las mezclas de polímeros seleccionadas, a pesar de ser las de menor tamaño empleando dicha técnica, presentaron un diámetro mayor al deseable para su aplicación en industria alimentaria. Es importante reducir al mínimo el efecto de la adición de las perlas sobre las características sensoriales del producto alimentario (p.ej. yogur) para una mejor aceptación del mismo por parte del consumidor (Adhikari, *et al.*, 2003; Kailasapathy, 2006), por lo que mediante la aplicación del generador electrostático de goteo se pretendió evitar un tamaño excesivo de las mismas que pueda alterar estas características.

Mediante el empleo del método del generador electrostático de goteo se consiguió con éxito una reducción del tamaño de las perlas con ambas mezclas poliméricas (1% Gelano:1% Jamilano y 0,75% Gelano:1% Xantano), sin que afectara en ningún aspecto a la forma de las mismas en comparación con las obtenidas con el método de goteo (Figura 28).

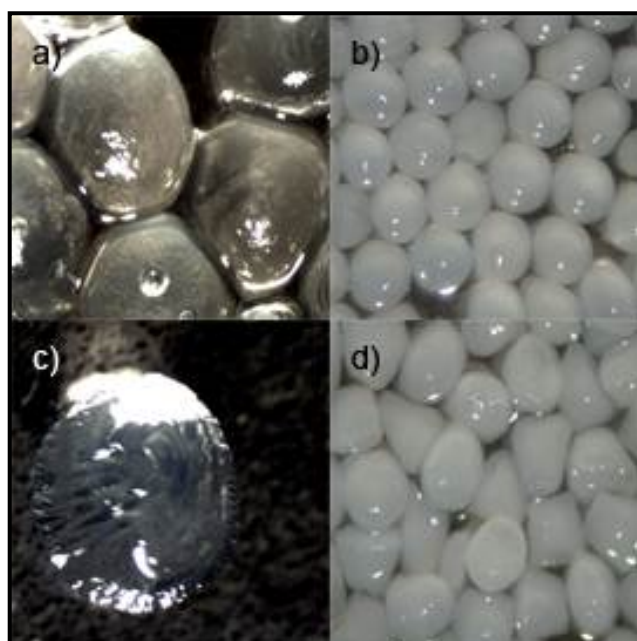


Fig. 28 Morfología y tamaño de las perlas obtenidas con diferentes mezclas poliméricas (amplificación 1x). a) Xantano:Gelano goteo simple, b) Xantano:Gelano generador electrostático de goteo; c) Jamilano:Gelano goteo simple; d) Jamilano:Gelano generador electrostático de goteo.

La observación al microscopio electrónico de barrido (SEM) reveló que ambos tipos de perlas presentaban una superficie homogénea, aunque las perlas de Xantano:Gelano evidenciaron una superficie más lisa que las de Jamilano:Gelano. Además, en ningún caso se detectaron cavidades o fracturas en dicha superficie (Figura 29).

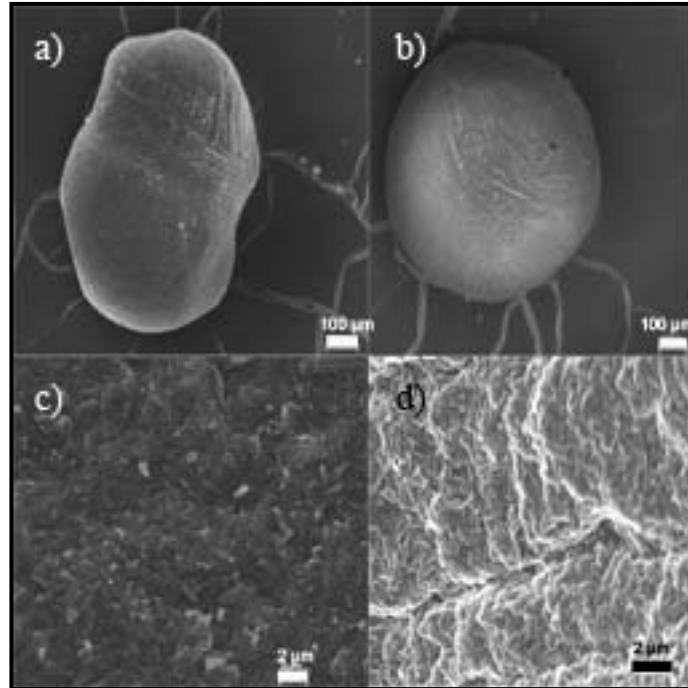


Fig. 29 Images del SEM de perlas obtenidas mediante el generador electrostático de goteo: a) y c) Perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%); b) y d) Perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%)

Junto con el análisis de la forma y superficie de las perlas, se realizó un estudio del tamaño y distribución de las perlas obtenidas con ambas mezclas de polímeros, datos que se muestran en la tabla 39. Se observa que las perlas formadas con Xantano:Gelano presentan un diámetro medio inferior a las de Jamilano:Gelano, aunque ambos se encuentran alrededor de los 2 mm de diámetro.

Tabla 39. Distribución del tamaño de las cápsulas obtenidas mediante el método del generador electrostático de goteo (n=170)

	Rango de tamaño (μm)	Diámetro equivalente (mm)	Diámetro medio (mm) ^a
Xantano:Gelano	750-3500	1,75	1,71 \pm 0,48
Jamilano:Gelano	1250-4000	2,25	2,47 \pm 0,54

^a Resultados expresados como Media \pm DS (n=170)

4.1.2 Optimización del método de desintegración de las perlas.

La liberación de los microorganismos probióticos inmovilizados dentro de las perlas es un paso importante dentro de la cuantificación de microorganismos dado que una desintegración incompleta de las perlas puede llevar a determinar un número menor que el real. Este hecho adquiere especial importancia cuando la mayoría de las investigaciones en este campo se han orientado a estudiar la resistencia de microorganismos probióticos encapsulados al pasaje por el tracto gastrointestinal (Ding & Shah, 2007, 2009b; Graff, *et al.*, 2008; Krasaekoopt, *et al.*, 2003).

En general, las perlas de alginato se desintegran mediante agitación en tampón fosfato (Chandramouli, *et al.*, 2004; Sheu & Marshall, 1993), pero para las perlas de gelano se han utilizado diversas técnicas dependiendo del autor, en las cuales se combinan tampones con procedimientos mecánicos, tales como tampón fosfato con mortero o sonicación (McMaster, *et al.*, 2005b; Sun & Griffiths, 2000) o EDTA con stomacher (Cinquin, *et al.*, 2004).

Debido a esta diversidad de técnicas y posibilidades, se ensayaron cinco tampones combinados con tres procedimientos mecánicos para la desintegración de las perlas (Tabla 40). En primer lugar se ensayó la agitación mecánica durante un mínimo de 30 minutos, pero este método no resultó efectivo con ninguno de estos tampones, ya que no se consiguió la desintegración completa de las perlas. Sin embargo, se observó una ligera desintegración con el tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7 y el EDTA 1%, pH 7, de manera que estos 2 tampones se seleccionaron para los siguientes experimentos.

Tabla 40. Tampones y métodos ensayados

Tampón	Método	Tiempo
Tampón Fosfato Sódico 0,05 M, pH 7	Agitación	30 min
Tampón Fosfato Sódico 0,1 M, pH 7	Sonicación	30 min
Tampón Fosfato Sódico 0,2 M, pH 7	Stomacher	6 min
Tampón Fosfato Sódico 1 M, pH 6,8 EDTA 1%, pH 7		

La sonicación no ejerció ningún efecto sobre las perlas, siendo descartado como procedimiento de desintegración. La aplicación de seis minutos en stomacher, en cambio, fue un método efectivo para la desintegración completa de las perlas, empleando ambos tampones. Ya que la desintegración se alcanzó con ambos tampones, se seleccionó el tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7, debido a su mayor compatibilidad fisiológica y además porque el EDTA presenta propiedades antimicrobianas que podrían afectar a la viabilidad de las cepas (Sivarooban, *et al.*, 2008). De este modo, el método de desintegración de las perlas para la cuantificación de microorganismos seleccionado fue una combinación de **tampón fosfato sódico 0,05 M, pH 7 con 6 min en stomacher**.

4.1.3 Efecto del procedimiento de formación de perlas en la viabilidad de las cepas probióticas.

El método de goteo para la encapsulación de probióticos ha sido ampliamente estudiado (Iyer, *et al.*, 2005; Kailasapathy, 2002; Krasaekoopt, *et al.*, 2003; Muthukumarasamy, *et al.*, 2006; Sun & Griffiths, 2000) e, igualmente, se ha probado la inocuidad del método del generador electrostático de goteo como método de inmovilización en diversos tipos de células (Manojlovic, *et al.*, 2006). Sin embargo el efecto que un potencial electrostático pueda ejercer durante el proceso de inmovilización en la supervivencia de microorganismos probióticos no ha sido estudiado previamente.

Así, la evaluación del efecto que el generador electrostático de goteo puede ejercer sobre nuestras cepas probióticas se hizo necesario, dada su efectividad para reducir el tamaño de las perlas. Para ello se comparó la supervivencia de las cepas probióticas tras la inmovilización con las dos mezclas de polímeros empleando las dos metodologías descritas (de goteo y generador electrostático de goteo). Igualmente se estudió la influencia del material de encapsulación en la supervivencia microbiana (Tablas 41 y 42).

Tabla 41. Efecto del método de inmovilización en microorganismos probióticos inmovilizados con Xantano:Gelano (1%:0,75%) (n=3)

	Generador electrostático de goteo			Extrusión/Goteo		
	Concentración		Eficiencia (%) ^b	Concentración		Eficiencia (%)
	Inicial ^a	Cápsulas ^a		Inicial	Cápsulas	
<i>L. plantarum</i> CRL 1815	10,93±0,15	10,64±0,21	54,72	10,96±0,09	10,86±0,09	79,35
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	10,46±0,16	10,01±0,13	36,43	10,69±0,11	10,58±0,17	84,86
<i>B. longum</i> ATCC BAA-999	10,17±0,09	9,32±0,31	16,34	10,96±0,14	10,72±0,02	62,78

^a Resultados expresados como log₁₀ unidades formadoras de colonias (UFC) (Media±DS) (n=3)
^b **Eficiencia de encapsulación.** Resultados expresados como porcentaje (%) de bacteria encapsulada= (UFC Concentración cápsulas / UFC concentración inicial)*100 (Media±DS) (n=3)

Tabla 42. Efecto del método de inmovilización en microorganismos probióticos inmovilizados con Jamilano:Gelano (1%:1%) (n=3)

	Generador electrostático de goteo			Extrusión/Goteo		
	Concentración		Eficiencia (%) ^b	Concentración		Eficiencia (%)
	Inicial ^a	Cápsulas ^a		Inicial	Cápsulas	
<i>L. plantarum</i> CRL 1815	10,93±0,15	10,50±0,19	37,47	11,09±0,07	10,92±0,15	71,05
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	10,52±0,10	10,22±0,11	51,10	10,64±0,15	10,24±0,10	40,68
<i>B. longum</i> ATCC BAA-999	10,30±0,24	9,40±0,49	15,92	10,74±0,15	9,99±0,37	24,88

^a Resultados expresados como log₁₀ unidades formadoras de colonias (UFC) (Media±DS) (n=3)
^b **Eficiencia de encapsulación.** Resultados expresados como porcentaje (%) de bacteria encapsulada= (UFC Concentración cápsulas / UFC concentración inicial)*100 (Media±DS) (n=3)

Los resultados obtenidos indicaron que los valores de supervivencia microbiana no difirieron significativamente entre las 2 mezclas de polímeros empleadas en la inmovilización ($p < 0,05$), independientemente de la técnica aplicada, de tal manera que la matriz de inmovilización no influyó sobre la viabilidad de las cepas probióticas estudiadas.

Sin embargo, la aplicación de un potencial electrostático disminuyó significativamente la supervivencia bacteriana en las 3 cepas ($p < 0,05$), siendo la magnitud de esta disminución dependiente de la cepa ensayada (Tabla 43). En términos de supervivencia microbiana tras la encapsulación y eficiencia de encapsulación, *B. longum* ATCC BAA-999 fue la cepa más sensible a la aplicación del potencial electrostático, presentando una reducción en el

recuento bacteriano superior a 10^1 UFC, cepa que también mostró la menor eficiencia de encapsulación con ambas metodologías, pero principalmente con el generador electrostático de goteo. Estos datos contrastan con las 2 cepas del género *Lactobacillus*, las cuales mostraron una disminución más moderada de la supervivencia ($\leq 10^1$ UFC).

Tabla 43. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95%.

	<i>L. plantarum</i> CRL 1815	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	<i>B. longum</i> ATCC BAA-999
Diferencia de medias (Ma* – Mb ⁺)	0,317	0,297	0,999
Error estándar (a-b)	0,0952	0,103	0,261

* a: método de goteo
⁺ b :metodología del generador electrostático de goteo

Aunque la supervivencia bacteriana disminuyó significativamente debido al uso de un potencial electrostático durante la inmovilización ($p < 0,05$), los recuentos de microorganismos viables permanecieron dentro de un rango de 10^8 - 10^9 UFC/g de perlas, cantidad que está en concordancia con los requerimientos de la International Dairy Federation para productos lácteos, la cual establece que estos productos han de contener 10^7 UFC/ g de producto a la fecha de caducidad (Ouwehand & Salminen, 1998). Estos valores de supervivencia junto con la marcada reducción del tamaño de las perlas llevaron a seleccionar el **método del generador electrostático de goteo** como el método a emplear en la presente tesis para los siguientes estudios.

4.1.4 Determinación de la temperatura de fusión de los geles de polímeros microbianos.

Para este estudio se prepararon geles de Xantano:Gelano (1%:0,75% m/v) así como de Jamilano:Gelano (1%:1% m/v) disolviendo los polímeros en agua milliQ (80°C) y posteriormente enfriándolos a temperatura ambiente. En la Figura 30 se muestran los termogramas obtenidos en la calorimetría diferencial de barrido o DSC de ambos geles, comprendido entre un rango de temperaturas que va de 20°C a 90°C. No se observaron picos de absorción dentro del rango de temperatura estudiada, mostrando que no tiene lugar ninguna transición de fase entre 20°C y 90°C para estas soluciones de polímeros. De acuerdo con esto, cualquier tipo de desintegración de las perlas durante los ensayos de supervivencia no puede ser asociado a la temperatura, ya que estos fueron llevados a cabo a temperatura fisiológica (37°C).

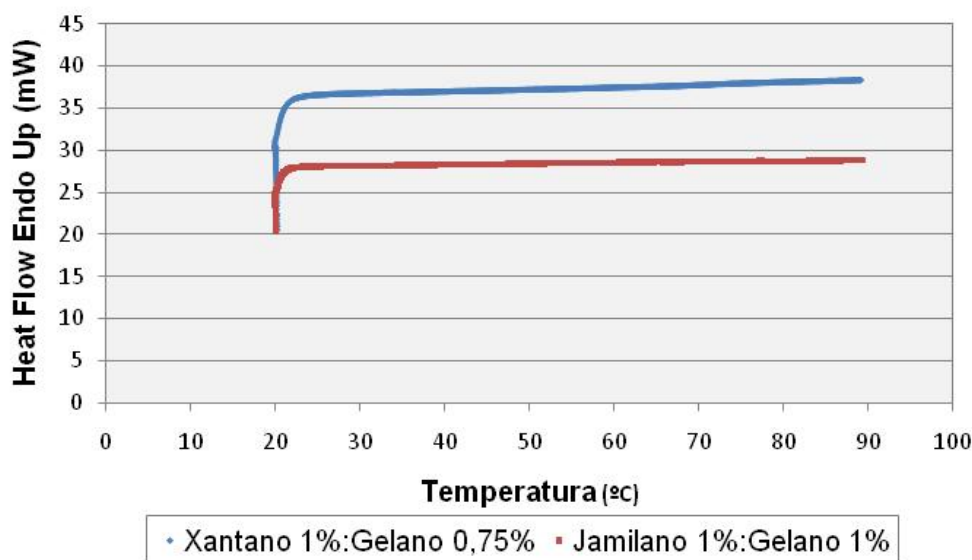


Fig.30 DSC termogramas de las soluciones de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%)

4.1.5 Determinación de las características mecánicas de las perlas con microorganismos probióticos.

Perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) con microorganismo probiótico inmovilizado y preparadas mediante el método del generador electrostático de goteo se sometieron a un análisis de compresión mediante barrido de presión, obteniéndose curvas de tensión-deformación de cada tipo de perlas. Para ello se realizaron 3 mediciones con perlas de cada tipo de solución de polímeros y las curvas resultantes se muestran en la figura 31.

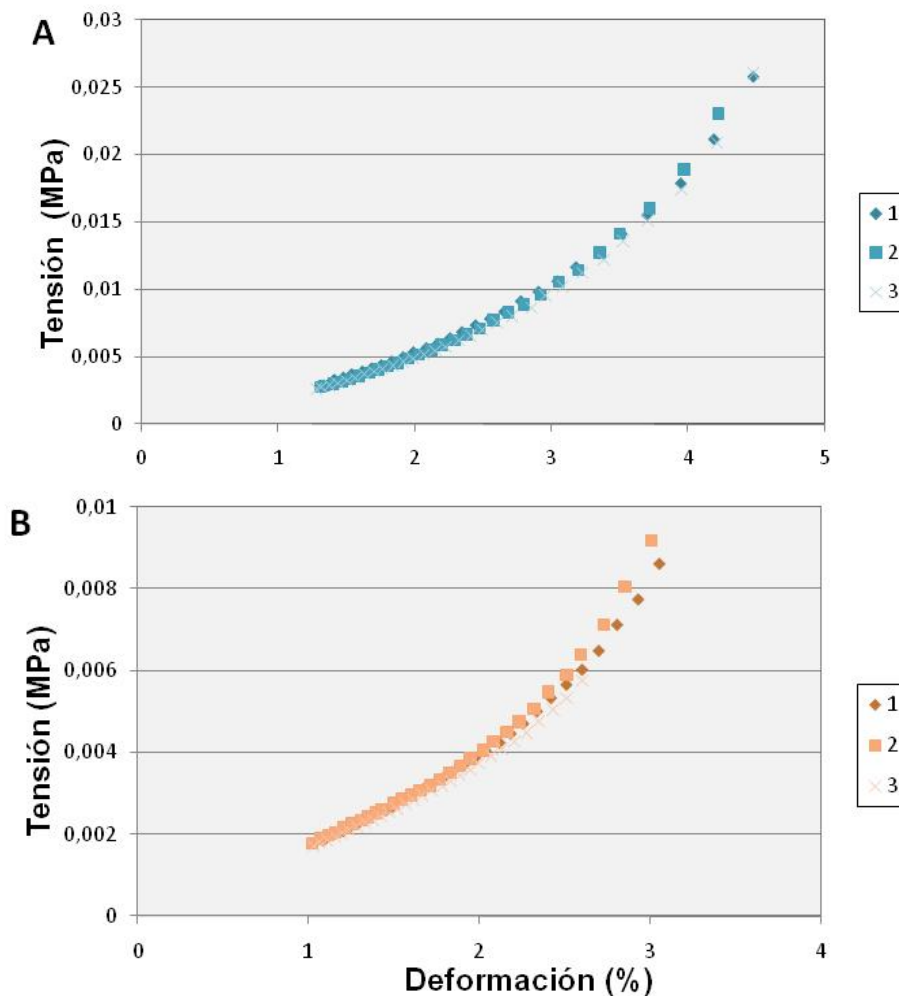


Fig.31 Curva tensión-deformación de 3 réplicas (1,2,3) experimentales de perlas.

A. Xantano:Gelano (1%:0,75%); B. Jamilano:Gelano (1%:1%)

Si un sólido presentara un comportamiento elástico ideal, se ajustaría a la ley de Hooke y estas curvas tendrían un carácter lineal. En cambio, ambos tipos de perlas presentaron un perfil no lineal, ajustado a una curva exponencial, aunque la tensión resultante como resultado de la aplicación de la deformación fue menor en las perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%). Tanto las perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) como las de Jamilano:Gelano (1%:1%) presentaron, a bajas deformaciones (1-3%), un comportamiento de “ablandamiento de la deformación (strain softening)” debido a que la tensión aumentó más lentamente con la deformación que en el caso un sólido elástico ideal ajustado a la ley de Hooke; pero a altas deformaciones comenzaron a presentar un comportamiento de “endurecimiento de la deformación (strain hardening)”, debido a que la tensión aumentó más rápidamente, que un sólido elástico ideal, con la deformación (Bot, *et al.*, 1996). De acuerdo con esto, ambos tipos de perlas presentaron un comportamiento visco-elástico.

Estudios previos con el gelano mostraron una relación lineal entre la tensión y la deformación en ensayos de tensión, pero en ellos se emplearon mayores concentraciones de gelano (2%) y se aplicaron valores mayores de deformación (Teratsubo, *et al.*, 2002). Las perlas empleadas en nuestro estudio contenían concentraciones inferiores de gelano al de dicho estudio, el cual también estaba mezclado con otros polímeros microbianos, y se emplearon valores inferiores de deformación, factores que podrían explicar la relación no lineal entre la tensión y la deformación observada en dichas perlas.

Cualquier material seleccionado para la encapsulación de microorganismos probióticos debería ser capaz de atravesar el tracto gastrointestinal superior intacto, para proteger a la bacteria inmovilizada, y desintegrarse al llegar al tracto gastrointestinal inferior, para poder liberar los microorganismos en su lugar de acción y que ejerzan sus efectos beneficiosos (McMaster, *et al.*, 2005b). En las curvas de tensión-deformación de las perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) no se observó ninguna rotura o pico, mostrando que las perlas se mantuvieron intactas frente a las condiciones testadas. Este hecho, unido al comportamiento visco-elástico que presentan, las hizo un vehículo idóneo para la encapsulación de probióticos, ya que se mostraron lo suficientemente elásticas como para resistir el movimiento de deglución pero también, a tensiones muy grandes y mayores

a las testadas, podrían ser capaces de romperse para liberar los microorganismos.

4.1.6 Evaluación de la viabilidad frente a diferentes condiciones de almacenamiento de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular.

Las tres cepas probióticas concentradas en agua (*L. plantarum* CRL 1815, *L. rhamnosus* ATCC 53103 y *B. longum* ATCC BAA-999) así como encapsuladas en perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) mediante el método del generador electrostático de goteo, se almacenaron a 25°C y a 4°C para evaluar su viabilidad durante 90 días. Tanto las perlas como los microorganismos sin encapsular permanecieron hidratados y protegidos de la luz durante todo el estudio. El almacenamiento se realizó en todo momento en aerobiosis, puesto que se buscaron las condiciones más sencillas y de menor coste, fácilmente aplicables a procedimientos industriales. El número de microorganismos viables detectado cada 15 días, de acuerdo con lo descrito en los apartados 3.3.5 y 3.3.6, se muestran gráficamente en las figuras 32 y 33.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas mezclas de polímeros, pero sí entre las 2 condiciones de almacenamiento evaluadas (Tabla 44). Las perlas de *L. plantarum* CRL 1815 y *L. rhamnosus* ATCC 53103 mostraron números de microorganismos mayores significativamente a 25° C, mientras que en su forma no encapsulada el comportamiento fue el inverso, siendo a 4°C cuando se registró un número significativamente mayor ($p < 0,05$). *B. longum* ATCC BAA-999 sin encapsular, mostro mayores números a 25°C, con una diferencia de 10^2 UFC/mL entre ambas condiciones (25°C y 4°C) a lo largo de todo el estudio; en cambio, no hubo diferencias estadísticamente significativas cuando este microorganismo se encontraba encapsulado ($p < 0,05$).

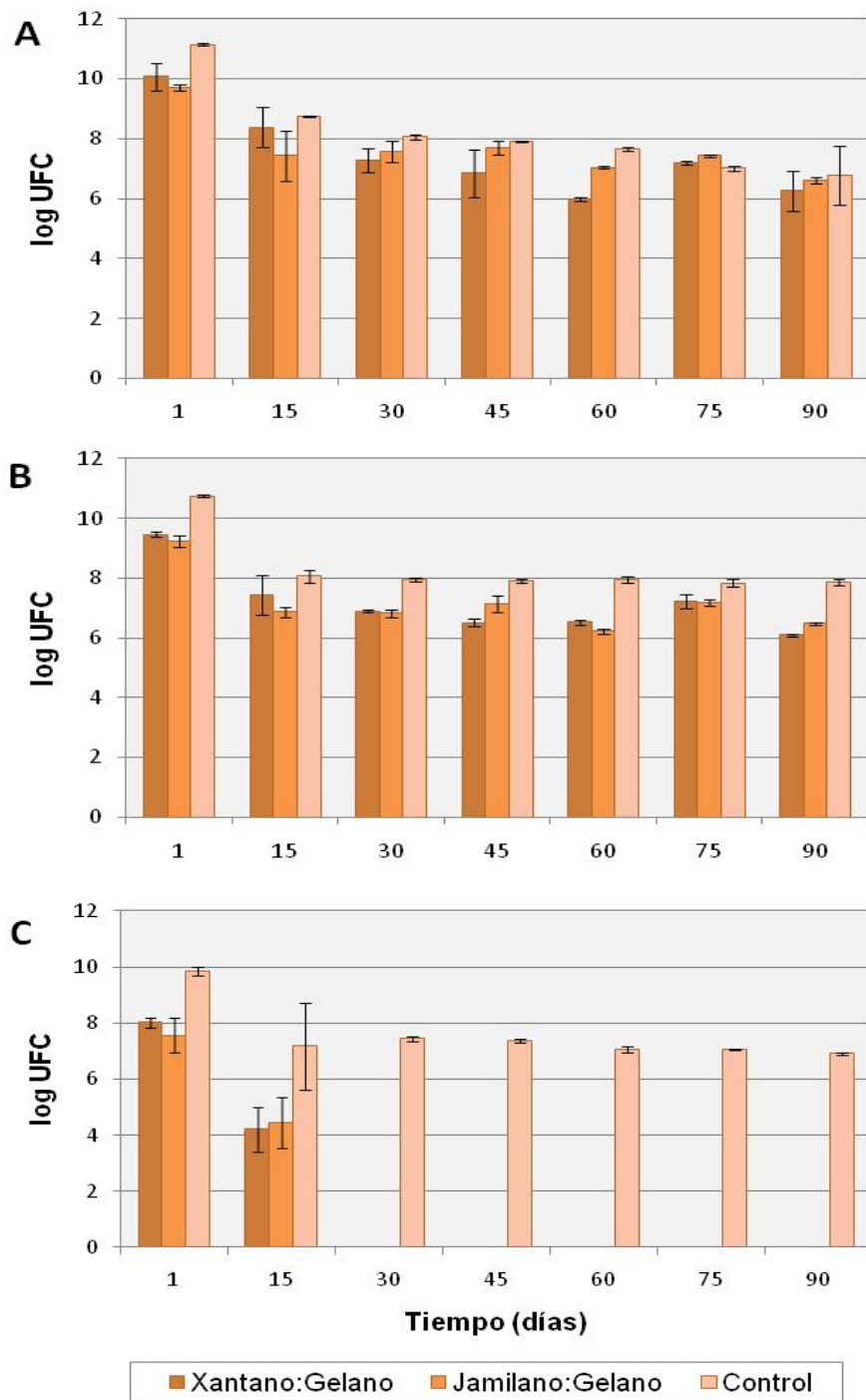


Fig. 32 Supervivencia de las cepas probióticas inmovilizadas y sin inmovilizar almacenadas a 25°C durante 90 días. **A.** *L. plantarum* CRL 1815; **B.** *L. rhamnosus* ATCC 53103; **C.** *B. longum* ATCC BAA-999

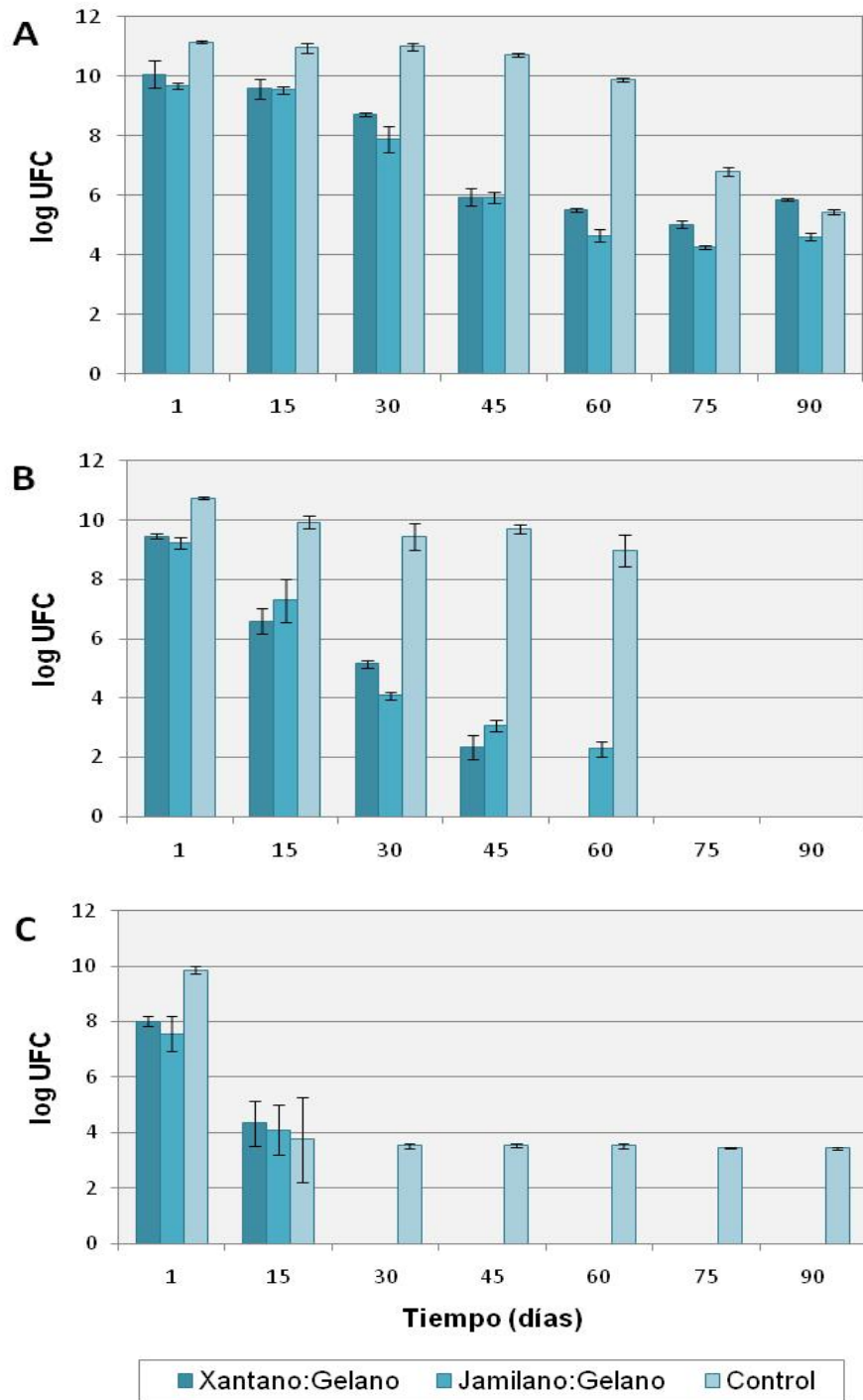


Fig. 33 Supervivencia de las cepas probióticas inmovilizadas y sin inmovilizar almacenadas a 4°C durante 90 días. A. *L. plantarum* CRL 1815; B. *L. rhamnosus* ATCC 53103; C. *B. longum* ATCC BAA-999

El tiempo de almacenamiento influyó también significativamente en la viabilidad de las cepas probióticas. Las perlas de *L. plantarum* CRL 1815 mostraron una disminución en el número de microorganismos viables a lo largo del tiempo hasta los 60 días, tiempo a partir del cual las cantidades se mantuvieron, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los días 60, 75 y 90. Esta cepa sin encapsular, mostró una bajada significativa a partir del día 75, especialmente notable cuando fue almacenada a 4°C.

Las perlas de *L. rhamnosus* ATCC 53103 mantuvieron un número muy estable a 25°C, pero no a 4°C en que la viabilidad microbiana comenzó a disminuir a partir de los primeros 15 días para llegar por debajo de los límites de detección de este estudio a los 75 días de almacenamiento. *L. rhamnosus* ATCC 53103 sin encapsular presentó un número muy estable a lo largo del tiempo, teniendo en cuenta 2 excepciones, una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad los primeros 15 días durante su almacenamiento a 25°C y una reducción por debajo de los límites de detección de este estudio a los 75 días de almacenamiento, cuando se almacenó a 4°C, fenómeno este último que también se produjo al ser encapsulado, como se ha descrito anteriormente.

B. longum ATCC BAA-999 encapsulado redujo significativamente el número de microorganismos a los 15 días de ser almacenado ($p < 0,05$), día a partir del cual los niveles bacterianos se mantuvieron por debajo de los límites de detección de este estudio. Esta cepa sin encapsular, sin embargo, resistió mejor el almacenamiento, con una reducción significativa de la viabilidad los primeros 15 días ($p < 0,05$) tras la cual mantuvo sus números hasta el final del estudio.

Tabla 44. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95%.

	<i>L. plantarum</i> CRL 1815		<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103		<i>B. longum</i> ATCC BAA-999	
	Perlas	Libre	Perlas	Libre	Perlas	Libre
Diferencia de medias (Ma* – Mb*)	0,57	-1,24	2,86	-1,25	-	3,2
Error estándar (a-b)	0,132	0,131	0,109	0,205	-	0,0344

*a: 25°C; b: 4°C

Estadísticamente, se detectó que la temperatura y el tiempo de almacenamiento influyeron sobre los valores de supervivencia también de manera combinada. Este hecho se observó con *L. plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular, *L. rhamnosus* ATCC 53103 encapsulado y *B. longum* ATCC BAA-999 sin encapsular (Figuras 34 y 35).

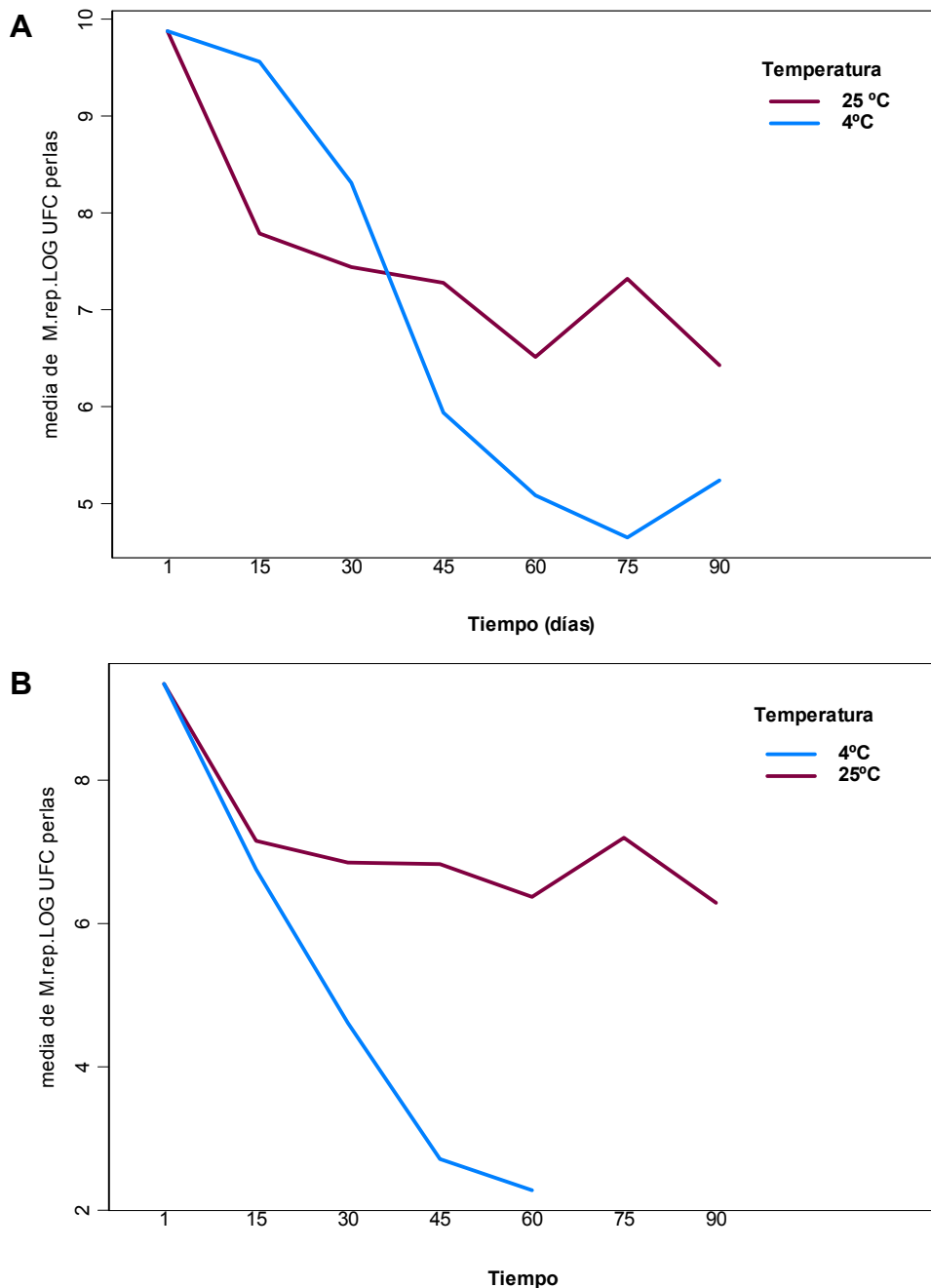


Fig. 34 Gráficos de interacción Temperatura (Ta)-Tiempo de almacenamiento (To). A. Perlas de *L. plantarum* CRL 1815 B. Perlas de *L. rhamnosus* ATCC 53103

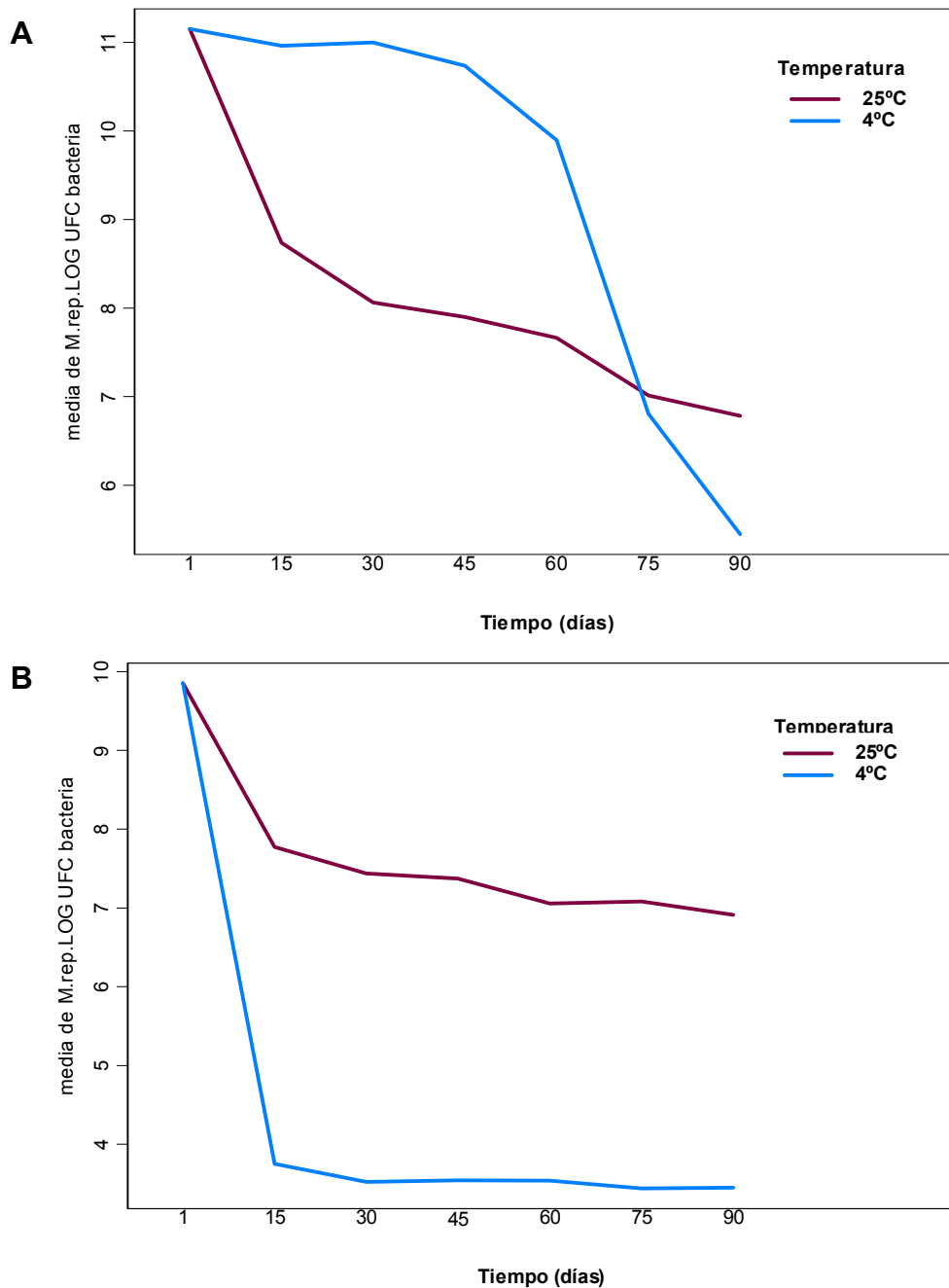


Fig. 35 Gráficos de interacción Temperatura (Ta)-Tiempo de almacenamiento (To). A. *L. plantarum* CRL 1815 libre B. *B. longum* ATCC BAA-999 libre.

Hasta este momento se han detectado pocos estudios en relación a las condiciones de almacenamiento sin incorporar el microorganismo o las cápsulas a algún alimento (Crittenden, *et al.*, 2006; O'Riordan, *et al.*, 2001; Weinbreck, *et al.*, 2010) y, de ellos, algunos no realizaron las comparaciones con microorganismo sin encapsular (Hsiao, *et al.*, 2004; Oliveira, *et al.*, 2007). En estos experimentos se obtuvieron resultados dispares, dependiendo principalmente de la cepa inmovilizada y del material empleado como matriz de

la cápsula. De este modo, los resultados previamente expuestos sólo pueden ser analizados en el contexto de este trabajo.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, no se puede concluir que la encapsulación con Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) mejore la viabilidad de estas cepas probióticas durante su almacenamiento. Al contrario, se obtuvo un mayor número de microorganismos en las condiciones sin encapsular, especialmente cuando éstas fueron almacenadas a 4°C. Es de destacar que ambos lactobacilos inmovilizados, independientemente del polímero empleado, presentaron un mayor número de microorganismos cuando se almacenaron a 25°C. Esto podría ser debido a que, a esta temperatura, los microorganismos pueden estar metabólicamente activos y emplear los polímeros, que recordemos son exopolisacáridos, como fuente de azúcar para mantenerse. *B. longum* ATCC BAA-999 presentó un comportamiento único, en el cual al ser inmovilizado su viabilidad disminuyó mucho más rápidamente y drásticamente que cuando no lo estaba, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Esto podría deberse a algún tipo de interacción entre esta cepa y los polímeros empleados o a una acumulación de metabolitos producidos por este microorganismo dentro de la matriz que pudieran ser tóxicos para el mismo.

4.2 Estudios *in vitro* de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral.

4.2.1 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en diferentes pH.

El estudio de la viabilidad de las tres cepas probióticas (*L. plantarum* CRL 1815, *L. rhamnosus* ATCC 53103 y *B. longum* ATCC BAA-999), encapsuladas en perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) mediante el método del generador electrostático de goteo y también sin encapsular, se ensayó frente a diferentes pH (2; 3,5; 5; 6,5) durante 24 horas. El número de microorganismos se determinó en las perlas con probiótico

(Cápsulas), los microorganismos que difundieron de las perlas al medio (Bacteria Liberada) y los controles realizados con el microorganismo sin encapsular (Bacteria Control). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 36 y 37.

Todas las cepas fueron sensibles a los cambios de pH, presentando diferentes perfiles de viabilidad en función de los mismos. Dentro de esta sensibilidad, las cepas de *Lactobacillus*, y especialmente *L. plantarum* CRL 1815, fueron más resistentes a la exposición que *B. longum* ATCC BAA-999. La exposición a pH 2 fue la más agresiva para las tres cepas probióticas, dándose tras su exposición disminuciones del orden de 10^2 - 10^4 UFC en ambos lactobacilos y niveles bacterianos por debajo de los límites de detección para la bifidobacteria. En cualquier caso, no se detectó supervivencia tras 6 horas de exposición frente a este pH.

Aunque la inmovilización con ambos materiales de encapsulación (Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%]) no parece que tuviera ningún efecto protector en la supervivencia microbiana a pH 2, sí se observó que esta inmovilización permitió que el número de microorganismos se mantenga estable durante el estudio con los restantes pH. La excepción se obtuvo con *B. longum* ATCC BAA-999, que mostró un número menor en su forma inmovilizada, en comparación con su estado libre.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre ambos materiales de inmovilización, relativas a la protección frente a los diferentes pH de los microorganismos. Sin embargo, la difusión de las células de las perlas al medio fue significativamente superior desde las perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) en todos los casos (Tabla 45).

Tabla 45. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95% de la bacteria difundida al medio.

	<i>L. plantarum</i> CRL 1815	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	<i>B. longum</i> ATCC BAA-999
Diferencia de medias (Ma* – Mb*)	0,257	0,394	1,290
Error estándar (a-b)	0,0553	0,117	0,186
*a: Xantano:Gelano (1%:0,75%)			
*b: Jamilano:Gelano (1%:1%)			

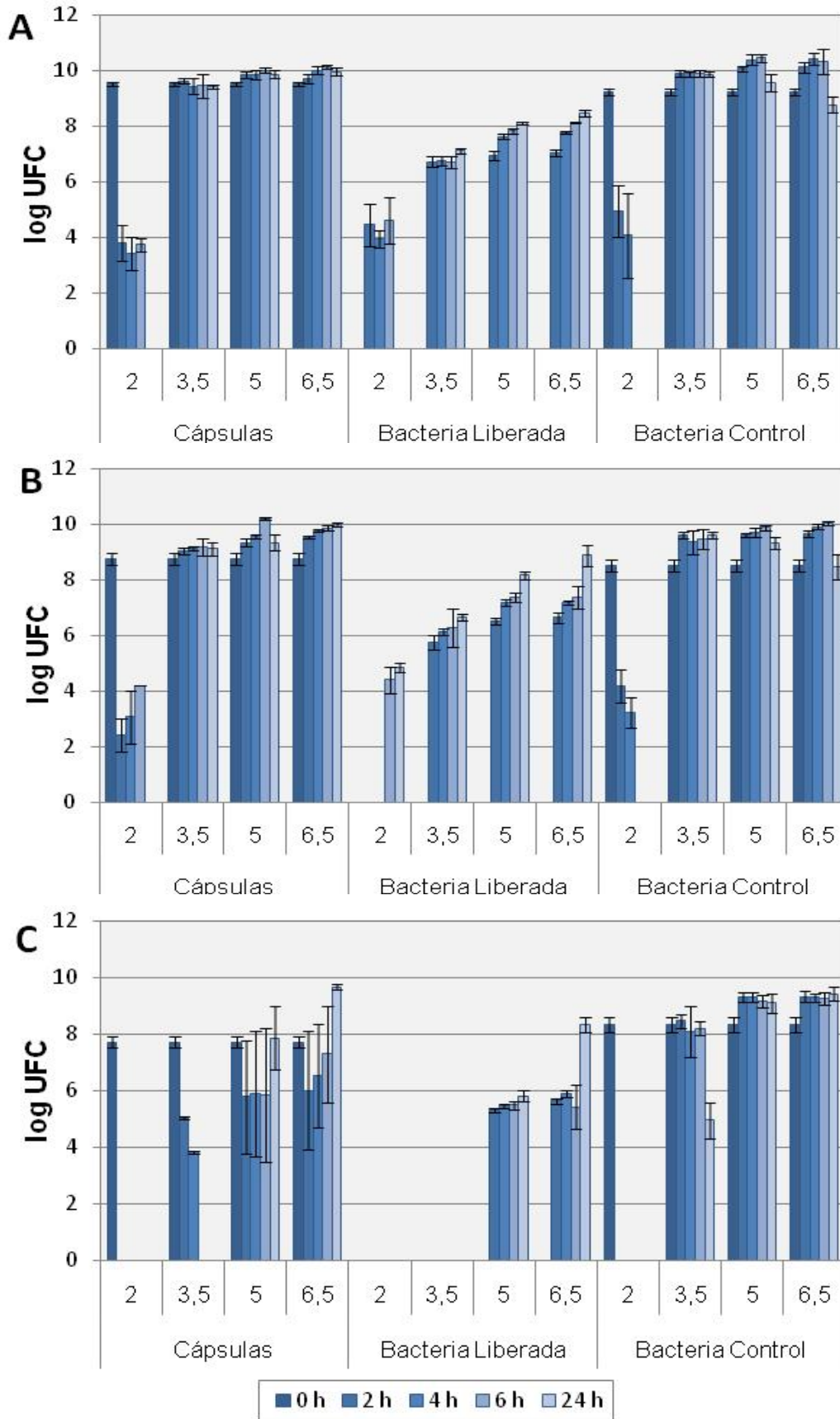


Fig. 36 Efecto de diferentes pH (2; 3,5; 5; 6,5) en la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular con Xantano:Gelano (1%:0,75%). A. *L. plantarum* CRL 1815; B. *L. rhamnosus* ATCC 53103; C. *B. longum* ATCC BAA-999

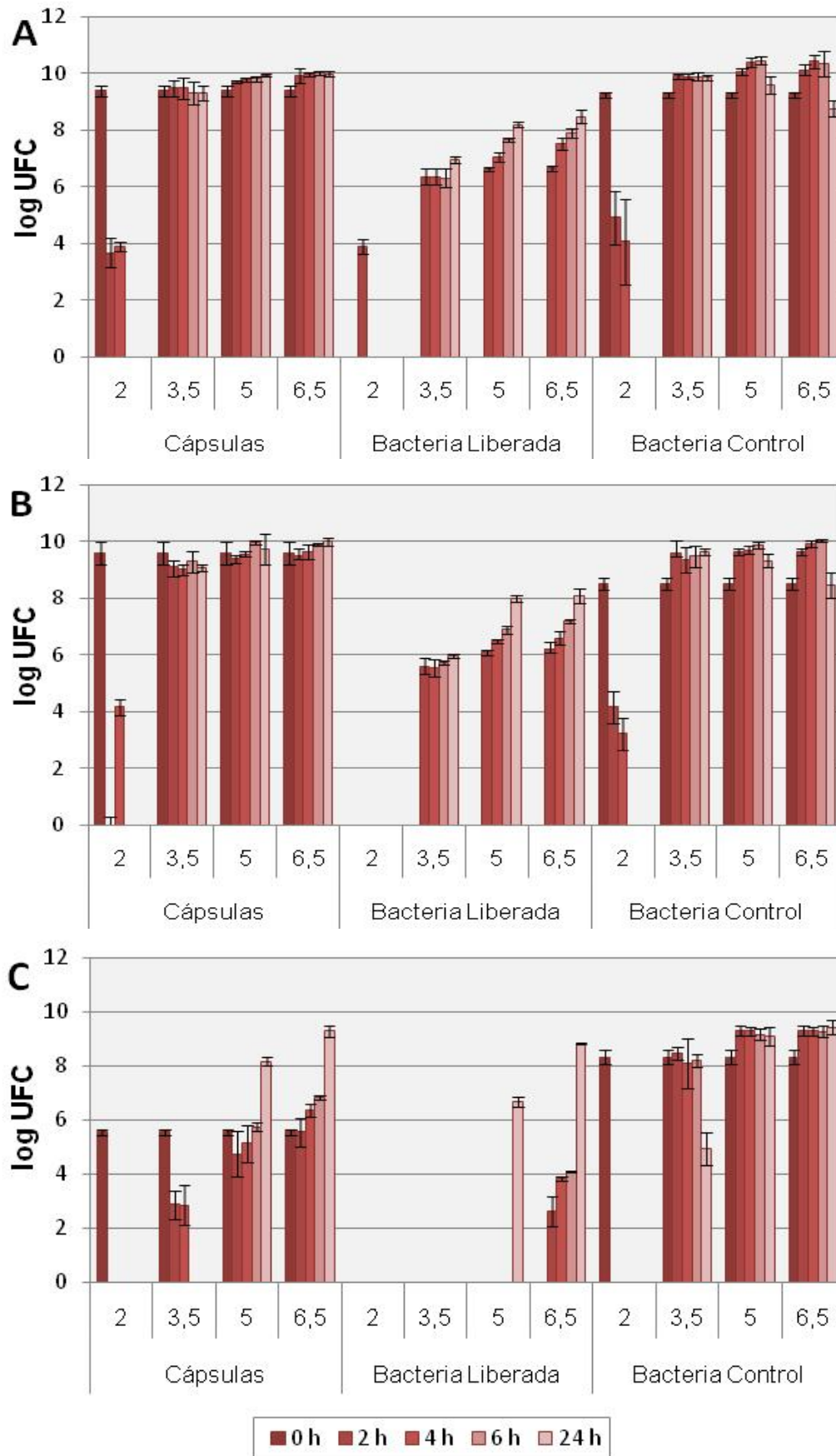


Fig. 37 Efecto de diferentes pH (2; 3,5; 5; 6,5) en la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular con Jamilano:Gelano (1%:1%).
A. *L. plantarum* CRL 1815; **B.** *L. rhamnosus* ATCC 53103; **C.** *B. longum* ATCC BAA-999

La viabilidad también se vio modificada por el tiempo de exposición a cada uno de los pH. De este modo, los lactobacilos sin encapsular mostraron una tendencia creciente de resistencia hasta las 6 h a pH 5 y 6,5, tiempo a partir del cual se detectó una reducción estadísticamente significativa de su número a las 24 h ($p < 0,05$), más pronunciada para el pH 6,5. *B. longum* ATCC BAA-999 sin encapsular también mostró una reducción significativa en el número de microorganismos viables a las 24 h a pH 3,5 ($p < 0,05$).

Mediante estudios estadísticos se vio que la interacción de los factores estudiados (pH, material de encapsulación y tiempo de exposición) también ejerció algún tipo de influencia en algunos casos, especialmente en las células liberadas de las cápsulas al medio. El número de todos los microorganismos, al difundir de las perlas al medio, se vio influenciado por la interacción entre el pH y el tiempo de exposición (Figura 39), estando la bifidobacteria también influenciada por la interacción entre el tiempo y el material de encapsulación empleado (Figura 38).

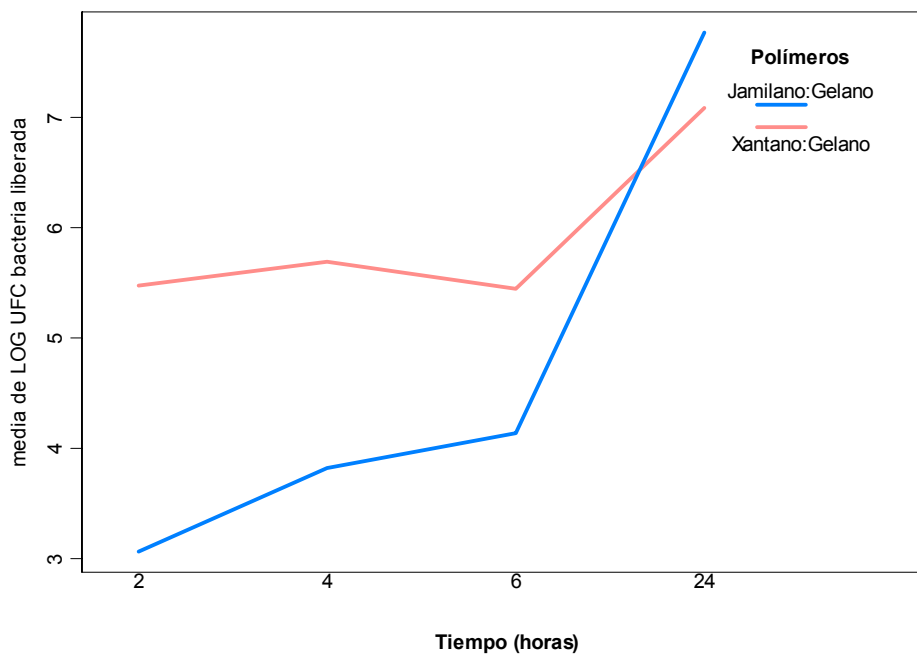


Fig. 38 Gráfico de interacción material de encapsulación-Tiempo de exposición de *B. longum* ATCC BAA-999 difundido de las perlas al medio.

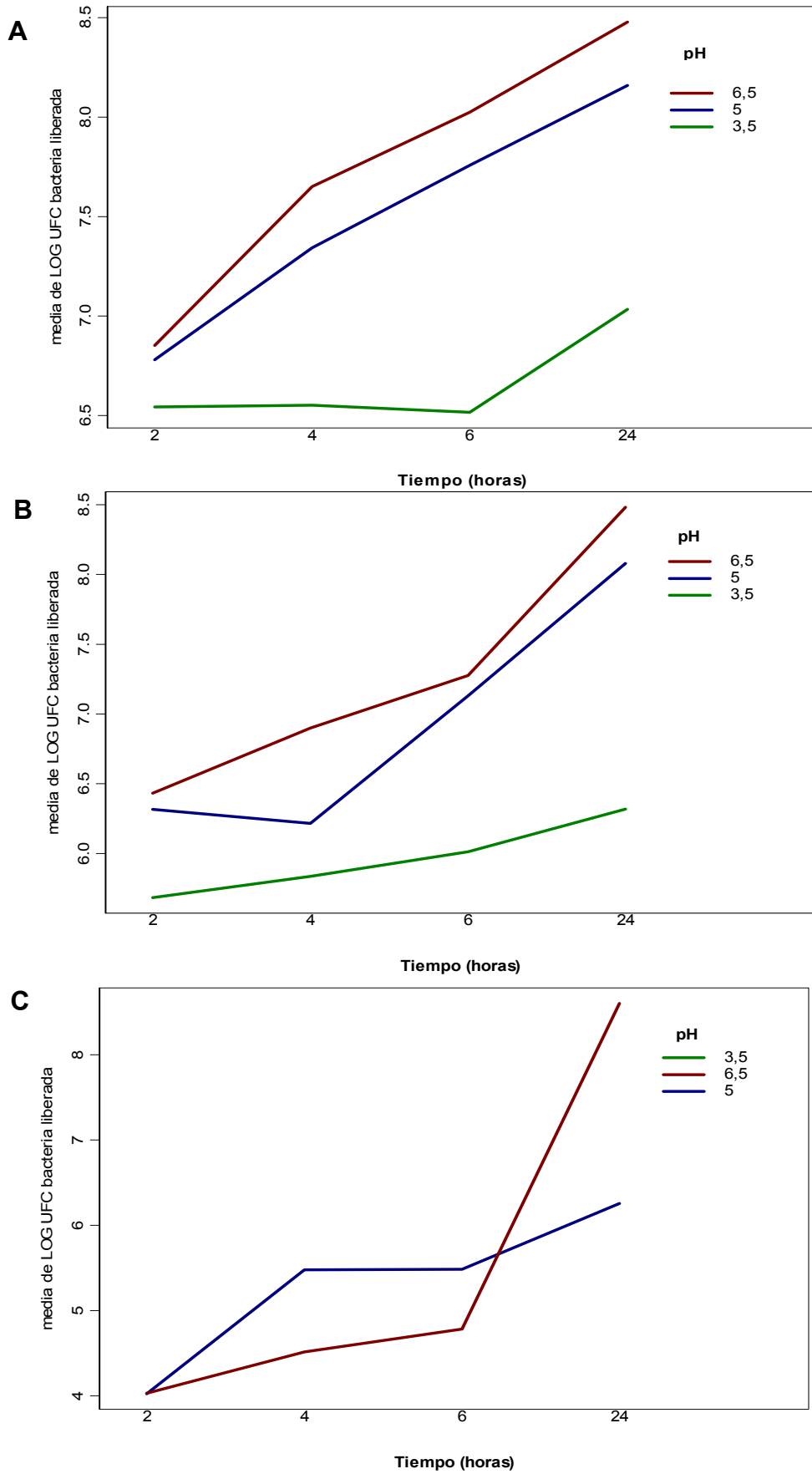


Fig. 39 Gráficos de interacción pH-Tiempo de exposición de la bacteria difundida de las perlas al medio. **A.** *L. plantarum* CRL 1815 **B.** *L. rhamnosus* ATCC 53103 **C.** *B. longum* ATCC BAA-999.

Los resultados de este ensayo de resistencia de microorganismos en perlas a diferentes pH demostraron la influencia que tienen el pH sobre la supervivencia microbiana, efecto que resultó específico en cada una de las cepas ensayadas. A pesar de esta especificidad, en términos generales se puede afirmar que existió una marcada reducción de la viabilidad a pH muy ácidos (2, en general, y 3,5 también para la bifidobacteria). Desafortunadamente, ninguno de los materiales testados y empleados para la encapsulación (Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%]) ofrecieron una protección efectiva frente a pH 2, resultados que discrepan de investigaciones previas (McMaster, *et al.*, 2005a; Sun & Griffiths, 2000) en las cuales sí se demostró esta protección en el caso de cápsulas de Gelano:Xantano. Estos resultados contradictorios pueden deberse presumiblemente al menor tamaño de las perlas empleadas en nuestro estudio (Lee & Heo, 2000), a las cepas empleadas o al material de encapsulación y al tipo de red o malla más o menos compacta que éste forme (Muthukumarasamy, *et al.*, 2006).

Por otro lado, los lactobacilos inmovilizados no presentaron una disminución en el número tras 24 horas de exposición, como se detectó a pH 5 y 6,5 en su forma libre, disminución que podría haber sido causada por la acidificación del medio como consecuencia de un crecimiento microbiano excesivo y a la producción de ácidos por estas bacterias lácticas (Carr, *et al.*, 2002). Podría ser también que las células presenten diferencias en su resistencia a estos pH en sus fases estacionaria y exponencial. Por otro lado, la capacidad de ambas cepas de lactobacilos de crecer en la mayoría de los pH testados cuando difunden de las perlas, especialmente a pH 5 y 6,5, hace a las perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) un buen vehículo para realizar fermentaciones continuas (Doleyres, *et al.*, 2002; Doleyres, *et al.*, 2004).

4.2.2 Optimización de las condiciones del estudio de supervivencia frente a condiciones gastrointestinales simuladas mediante técnicas espectrofotométricas.

4.2.2.1 Curva de crecimiento de las cepas probióticas

Se realizó una evaluación del crecimiento de las tres cepas probióticas en MRS para establecer los parámetros de crecimiento a 37°C. Para ello se emplearon placas microtiter en las 200 µL de MRS se inocularon con los tres microorganismos, utilizando también MRS suplementado con 0,05% L-cisteína en el caso de *B. longum* ATCC BAA-999. El cultivo se realizó tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y su seguimiento se llevó a cabo mediante medidas espectrofotométricas a 2 longitudes de onda, 550 nm y 650 nm. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 40 y 41.

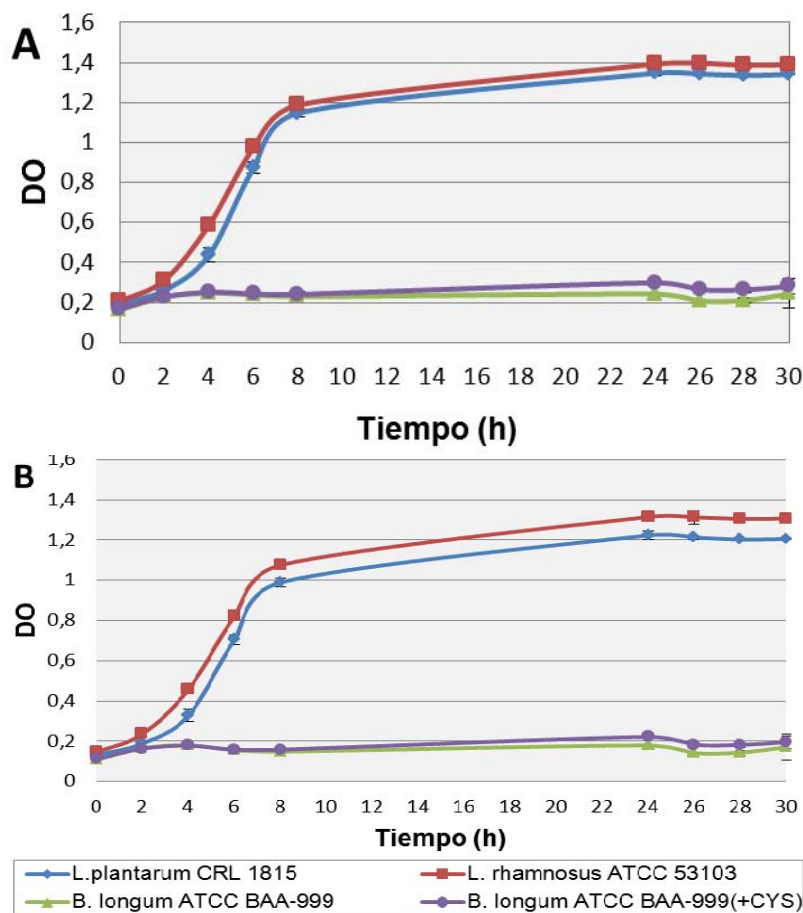


Fig. 40 Curvas de crecimiento en AEROBIOSIS de las cepas probióticas.

A. 550 nm B. 650 nm

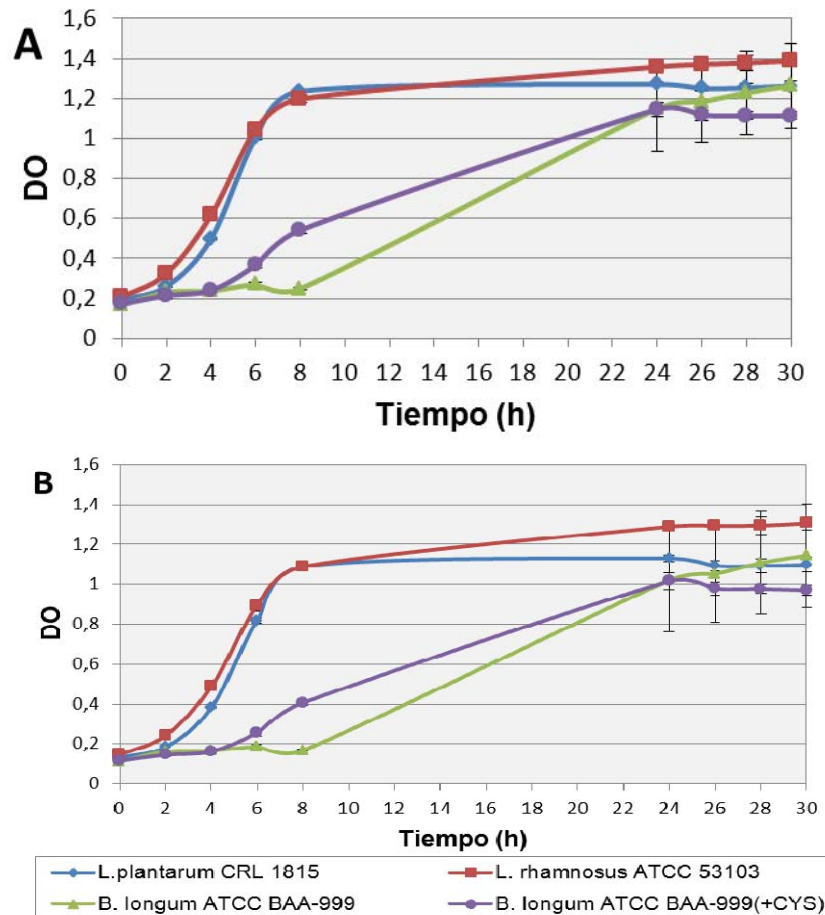


Fig. 41 Curvas de crecimiento en ANAEROBIOSIS de las cepas probióticas.

A. 550 nm B. 650 nm

Se observó que todas las cepas a las 24 horas de cultivo habían alcanzado su fase estacionaria, excepto el cultivo de *B. longum* ATCC BAA-999 sin cisteína. Las cepas de *Lactobacillus* presentaron un perfil similar tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, iniciando su fase exponencial tras la primera hora de cultivo, mientras que *B. longum* ATCC BAA-999 sólo fue capaz de crecer en anaerobiosis. La adición de cisteína al medio fue determinante para que *B. longum* ATCC BAA-999 iniciara su fase exponencial a las 4 horas, ya que a falta de este compuesto, transcurridas 8 horas de incubación no había iniciado esta fase. En cuanto a la longitud de onda empleada, a $\lambda=550$ nm se detectó mejor el crecimiento, especialmente en la fase estacionaria de *L. rhamnosus* ATCC 53103 y *B. longum* ATCC BAA-999, las cuales registraron menores absorbancias a $\lambda=650$ nm.

De este modo, para el desarrollo de los siguientes estudios espectrofotométricos se eligió una $\lambda=550$ nm para realizar las medidas de

absorbancia. Los lactobacilos se cultivaron en aerobiosis, por su mayor facilidad de manipulación y *B. longum* ATCC BAA-999 se cultivó en anaerobiosis con el medio adicionado de L-cisteína 0,05%.

4.2.2.2 Evaluación del crecimiento de cepas probióticas frente a la exposición de condiciones gastrointestinales simuladas.

A- Ensayo en condiciones individuales

El crecimiento microbiano de las tres cepas probióticas se testó frente a un abanico de diferentes condiciones gastrointestinales individualmente, entre las que se evaluaron distintos rangos de pH, pepsina, pancreatina y bilis. Para ello, se emplearon placas microtiter en las que 200 µL de MRS ajustado a la condición correspondiente, fueron inoculados con las tres cepas probióticas. En el caso de *B. longum* ATCC BAA-999 el medio se suplementó con cisteína. Las condiciones de cultivo y de lectura espectrofotométrica se llevaron a cabo de acuerdo con los resultados obtenidos en el punto 4.2.2.1. Las curvas de crecimiento obtenidas en estas condiciones se muestran en las figuras 42, 43, 44 y 45.

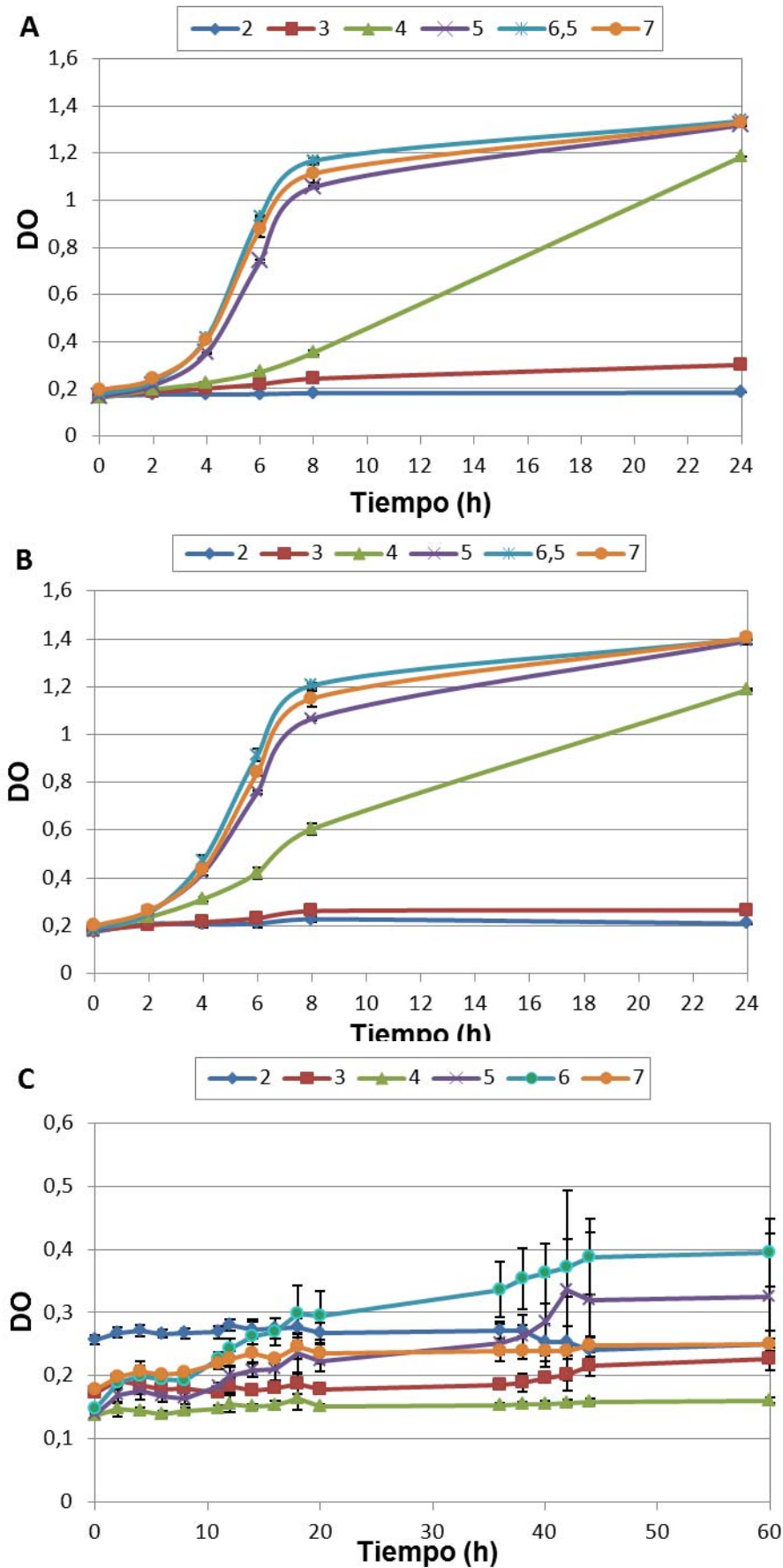


Fig. 42 Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes pH: A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-99

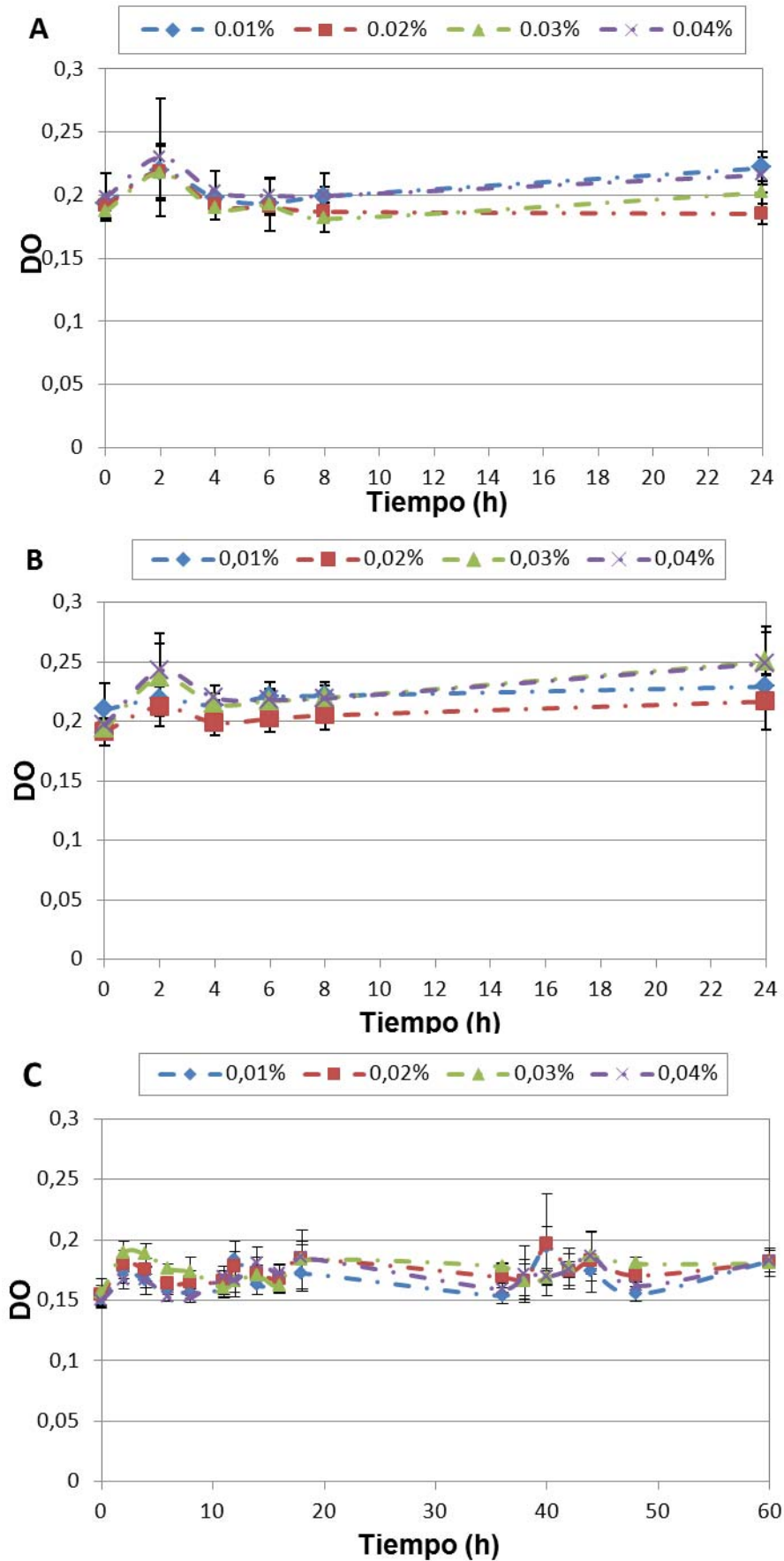


Fig. 43 Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes concentraciones de pepsina: **A.** *L. plantarum* CRL 1815 **B.** *L. rhamnosus* ATCC 53103 **C.** *B. longum* ATCC BAA-99

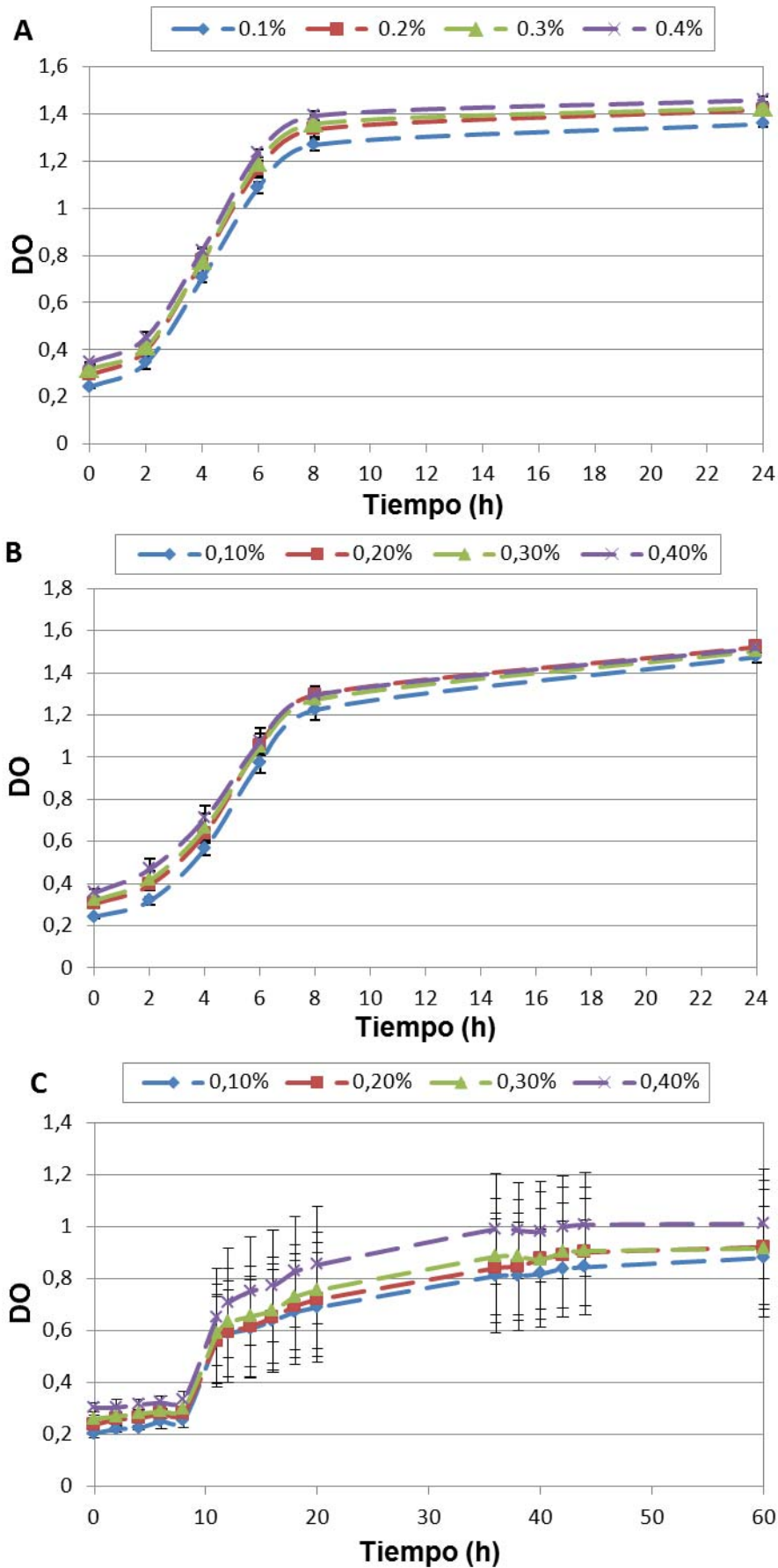


Fig. 44 Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes concentraciones de pancreatina: **A.** *L. plantarum* CRL 1815 **B.** *L. rhamnosus* ATCC 53103 **C.** *B. longum* ATCC BAA-99

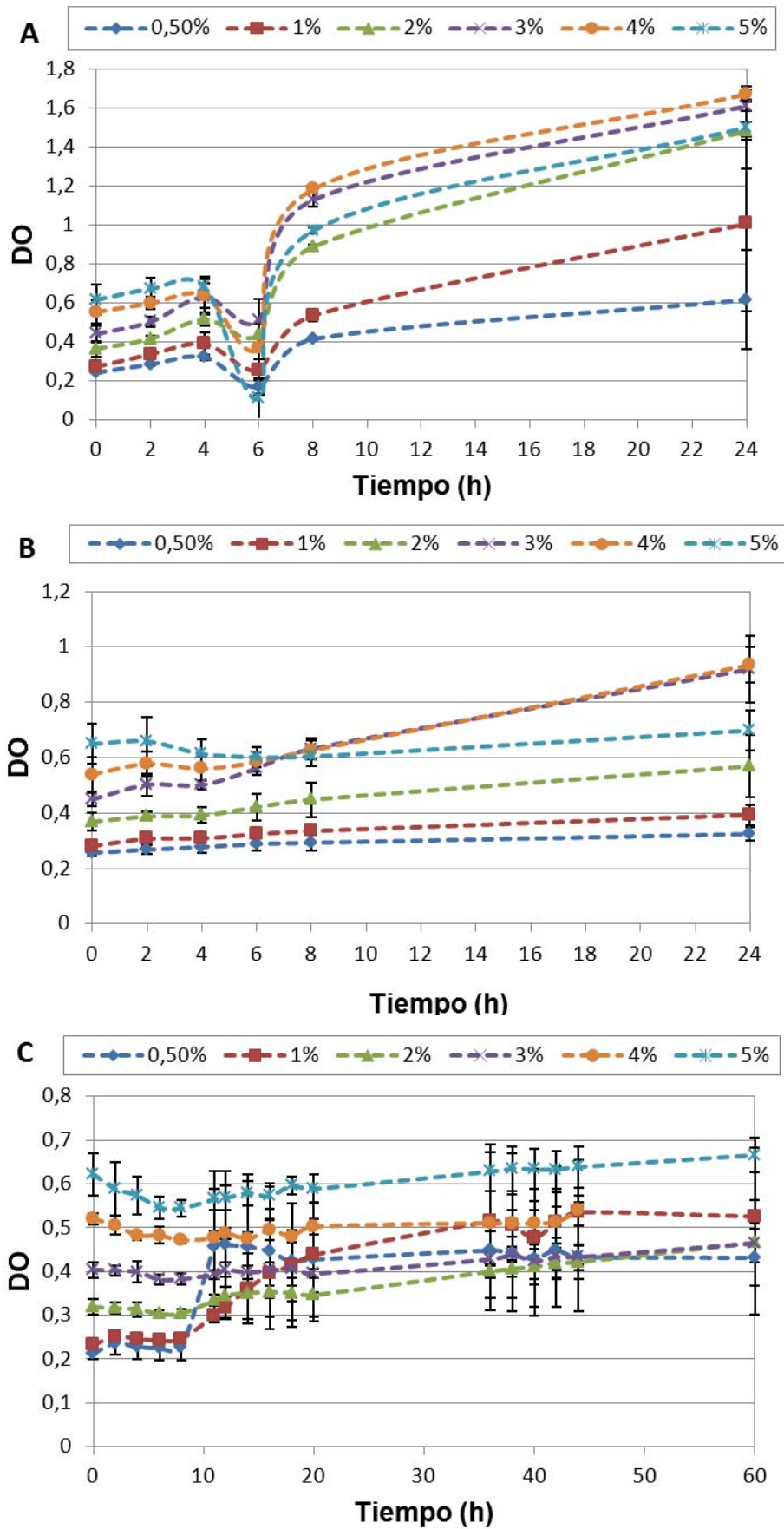


Fig. 45 Curvas de crecimiento en MRS ajustado a diferentes concentraciones de bilis: A. *L. plantarum* CRL 1815 B. *L. rhamnosus* ATCC 53103 C. *B. longum* ATCC BAA-99

Los perfiles de crecimiento de los lactobacilos y la bifidobacteria fueron diferentes, ya que la bifidobacteria fue mucho más sensible a las diversas condiciones a las que fue sometida, mostrando un crecimiento muy inferior en todos los casos.

Ambos lactobacilos fueron capaces de crecer a pH por encima de 4. A este pH 4 el crecimiento fue más lento, probablemente debido a la necesidad de los microorganismos de adaptarse al entorno ácido (Beales, 2004; Sanz, 2007). *L. rhamnosus* ATCC 53103, sin embargo, presentó un crecimiento ligeramente más rápido a pH 4 que *L. plantarum* CRL 1815, duplicando los niveles de absorbancia a las 8 horas de exposición. *B. longum* ATCC BAA-999, por su parte, fue mucho más sensible al pH, siendo capaz de crecer únicamente dentro de los pH 5-6,5 en concentraciones limitadas.

En cuanto los ensayos realizados con diferentes concentraciones de pepsina, no se puede afirmar que se haya detectado crecimiento con ninguna de las cepas. Para que esta enzima estuviera activa se tuvo que ajustar el medio a pH 3,5, ya que necesita un pH de 2-4 para ejercer su actividad. Tal como se describe, no se detectó crecimiento a pH 3,5, lo que puede haber causado la falta de crecimiento en esta prueba, no obteniéndose resultados concluyentes con respecto a la concentración de pepsina adecuada. Por otro lado, la adición de pancreatina al medio, independientemente de la concentración empleada, ejerció un efecto promotor del crecimiento microbiano con todas las cepas, especialmente notable con *B. longum* ATCC BAA-999.

El efecto de la bilis sobre el crecimiento microbiano fue notablemente dependiente de la cepa estudiada. *L. plantarum* CRL 1815, aunque tuvo una reducción en su crecimiento a las 6 horas de la exposición, una vez transcurrida la adaptación a esta condición presentó su máximo crecimiento a concentraciones de bilis del orden de 2-3%, aunque fue capaz de crecer a todas las concentraciones testadas. *L. rhamnosus* ATCC 53103 evidenció un crecimiento más moderado, pero presentó su máximo a concentraciones de 3-4% de bilis. *B. longum* ATCC BAA-999, por el contrario, mostró un crecimiento muy limitado en bilis, con máximos a una concentración de 0,5-1% de bilis.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron para el estudio secuencial las siguientes condiciones:

- *pH*: 3,5 y 4 para el jugo gástrico simulado, por estar por debajo o en el límite de tolerancia de estas cepas a pH ácido; 6,5 para el jugo pancreático y la bilis simulada.
- *Pepsina*: al no tener datos concluyentes con este estudio, se seleccionó una concentración intermedia de 0,03% (m/v).
- *Pancreatina*: todas las concentraciones presentaron un comportamiento similar, de manera que se eligió una concentración intermedia de 0,2%(m/v).
- *Bilis*: para los lactobacilos se seleccionó una concentración de un 3% (m/v), mientras que para la bifidobacteria se testaron 3 concentraciones, 1-1,5-2% (m/v).

B-Resistencia de microorganismos probióticos a condiciones gastrointestinales secuenciales

Una vez pre-seleccionadas las condiciones gastrointestinales individualmente simuladas en el punto 4.2.2.2.A, se realizó un estudio secuencial en el que se evaluaron dos tiempos de exposición: 2-2-2, es decir, 2 horas en jugo gástrico simulado, 2 horas en jugo pancreático simulado y de 2 a 24 horas en bilis simulada y 4-2-2, en el cual se amplía el tiempo de exposición en jugo gástrico simulado a 4 horas (Tabla 46). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 46, 47 y 48.

Tabla 46. Condiciones del ensayo

	Condiciones medios empleados			Tiempo de exposición	
	Reactivo	Concentración	pH	2-2-2	4-2-2
<i>Jugo gástrico simulado</i>	Pepsina	0,03%	3,5/4	2 h	4h
<i>Jugo pancreático simulado</i>	Pancreatina	0,2%	6,5	2 h	2 h
<i>Bilis simulada (Lactobacilos)</i>	Bilis	3%	6,5	Hasta 24h	Hasta 24h
<i>Bilis simulada (Bifidobacteria)</i>	Bilis	1%/1,5%/2%	6,5	Hasta 48h	Hasta 48h

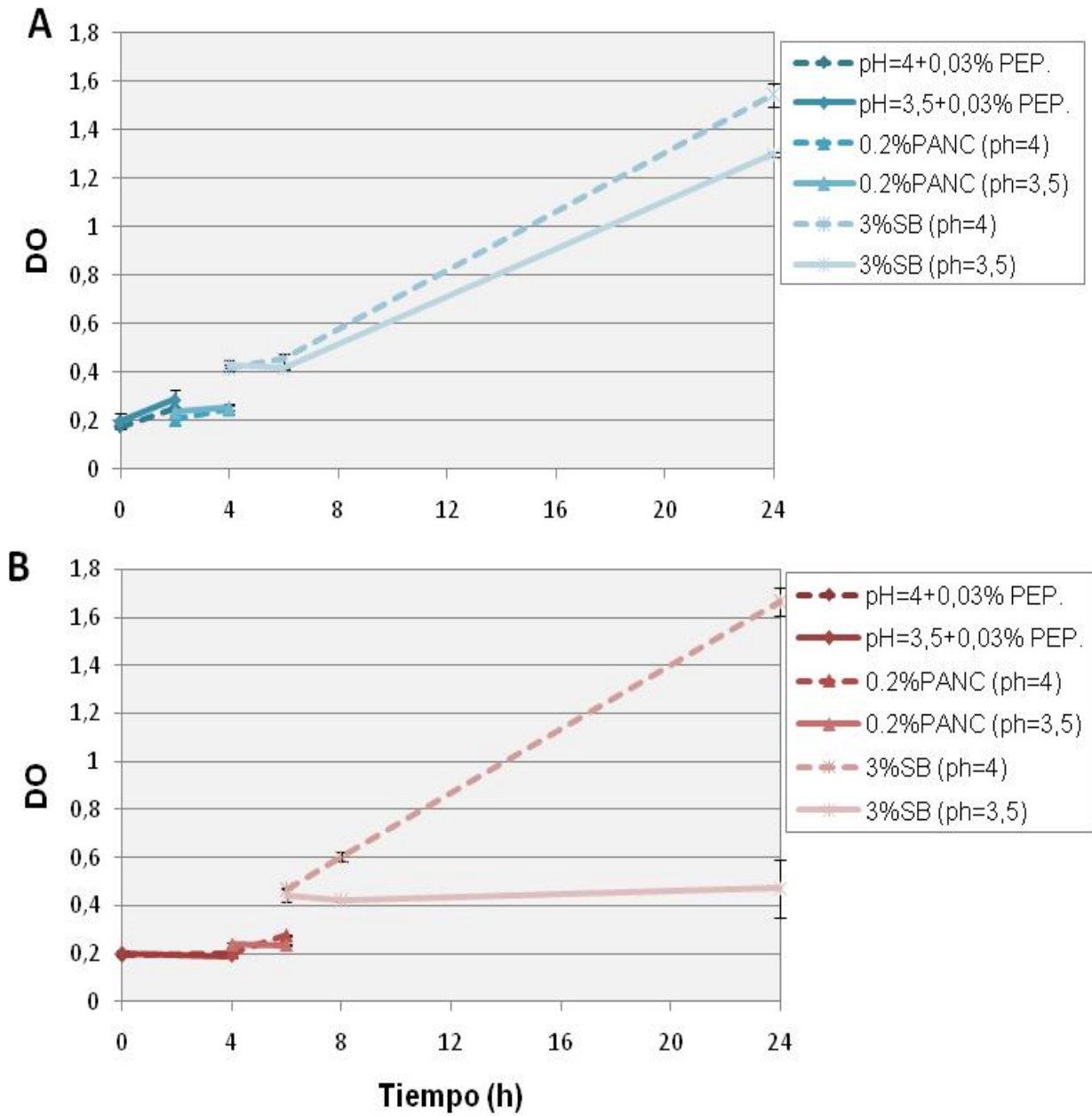


Fig. 46 Estudio secuencial de crecimiento frente a condiciones gastrointestinales simuladas de *L. plantarum* CRL 1815. A. 2-2-2 B. 4-2-2

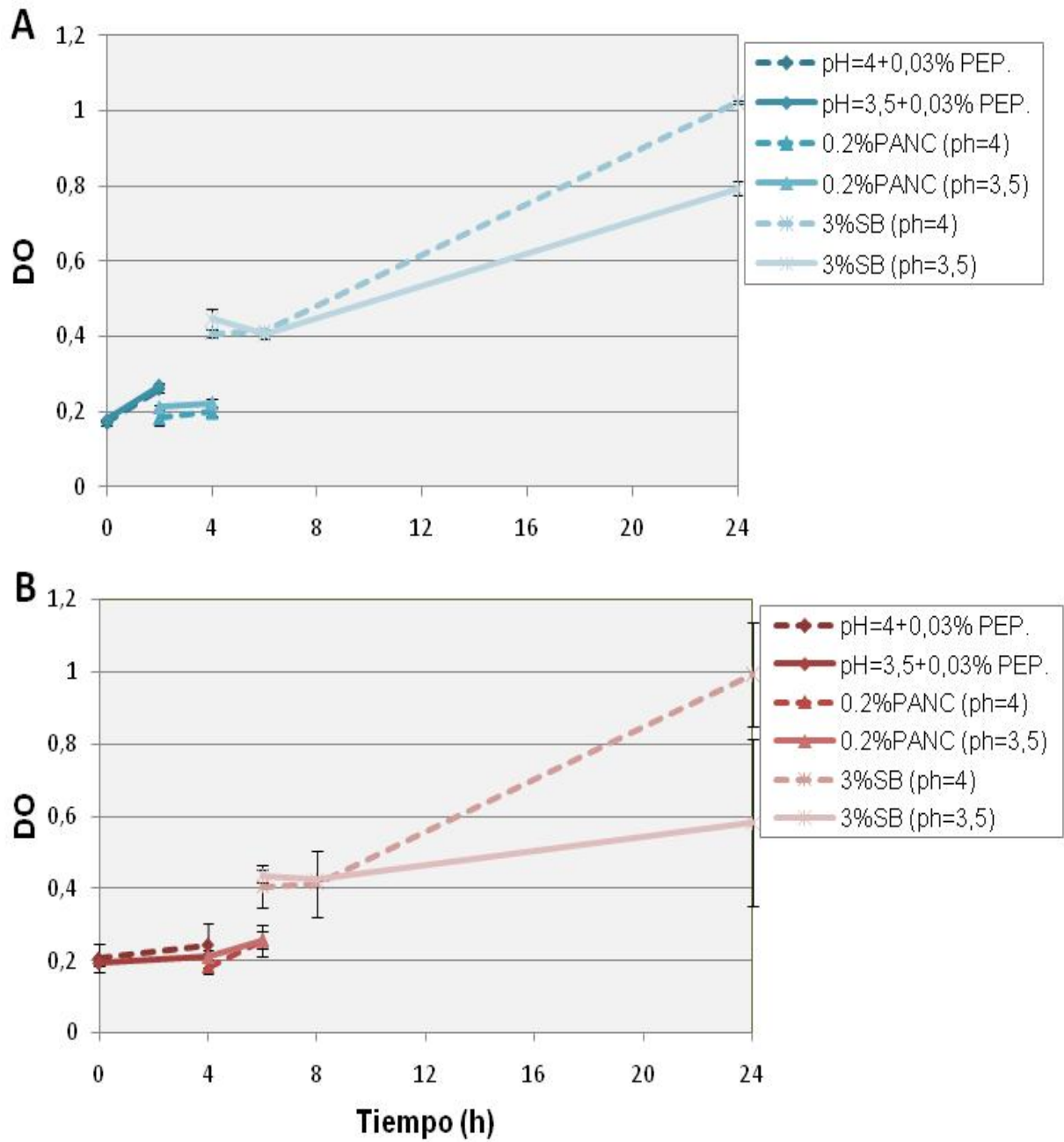


Fig. 47 Estudio secuencial de crecimiento frente a condiciones gastrointestinales simuladas de *L. rhamnosus* ATCC 53103. A. 2-2-2 B. 4-2-2

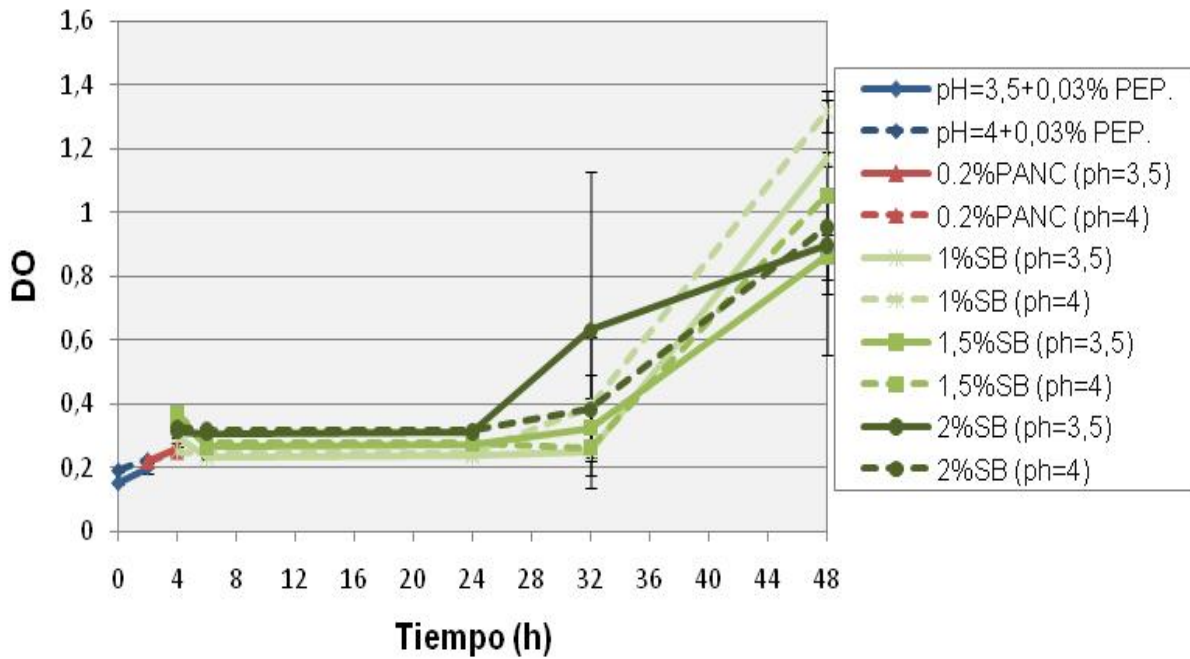


Fig. 48 Estudio secuencial de crecimiento frente a condiciones gastrointestinales simuladas de *B. longum* ATCC BAA-999.

Estas pruebas se realizaron inicialmente con los dos lactobacilos y, una vez obtenidos los resultados preliminares de exposición, se testó la bifidobacteria, por ser esta más sensible a las condiciones gastrointestinales simuladas que los primeros, de ahí que solo se muestre una única secuencia temporal para esta última.

Resulta evidente que la exposición durante 4 horas a pH ácido afecta a la viabilidad bacteriana, de tal manera que la exposición a pH 3,5 durante este tiempo resulta en una inhibición del crecimiento en las condiciones sucesivas. Este hecho no se observa a pH 4, a pesar de solo existir una diferencia de 0,5 entre ambos pH, lo que nos demuestra que un pH 4 es el límite de tolerancia de las cepas de lactobacilos empleadas al estrés ácido. Debido a este hecho, a que tras una exposición de 2 horas a pH 3,5 los microorganismos sí son capaces de crecer en las condiciones sucesivas y a que la duración de 2 horas se aproxima más a la fisiológica (90 min de estancia en el estómago (Noriega, *et al.*, 2004), se seleccionó como secuencia temporal 2-2-2.

Con *B. longum* ATCC BAA-999 no se registró tanta diferencia entre los pH como entre las diferentes concentraciones de bilis. La exposición a bilis ralentizó notablemente el crecimiento, empezando a detectarse a partir de las

32 horas de incubación. El mayor crecimiento, como era de esperar, se dio al exponerlo a 1% de bilis, pero al ser capaz de crecer con todas las concentraciones testadas y para emplear concentraciones más similares a las de los lactobacilos, se decidió escoger un 2% como la concentración de bilis a emplear en los ensayos de supervivencia.

Así, las condiciones finales seleccionadas para el ensayo de supervivencia fueron las siguientes (Tabla 47):

Tabla 47. Condiciones del ensayo de supervivencia

	Condiciones de los medios empleados			Tiempo de exposición
	Reactivo	Concentración	pH	
<i>Jugo gástrico simulado</i>	Pepsina	0,03%	3,5	2 h
<i>Jugo pancreático simulado</i>	Pancreatina	0,2%	6,5	2 h
<i>Bilis simulada (Lactobacilos)</i>	Bilis	3%	6,5	Hasta 24h
<i>Bilis simulada (Bifidobacteria)</i>	Bilis	2%	6,5	Hasta 48h

4.2.3 Evaluación de la supervivencia de microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular en condiciones gastrointestinales simuladas.

Con las condiciones previamente establecidas mediante técnicas espectrofotométricas (detalladas en el apartado anterior), se sometió a las tres cepas probióticas (*L. plantarum* CRL 1815, *L. rhamnosus* ATCC 53103 y *B. longum* ATCC BAA-999), encapsuladas en perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) mediante el método del generador electrostático de goteo y también sin encapsular, a un test de supervivencia frente a condiciones gastrointestinales simuladas. La exposición a las diferentes condiciones se realizó tanto de manera secuencial como individual y el número de microorganismos se determinó en las perlas con probiótico (Cápsulas), de los microorganismos que difundieron de las perlas al medio (Bacteria Liberada) y de los controles realizados con el microorganismo sin encapsular (Bacteria Control). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 49 y 50.

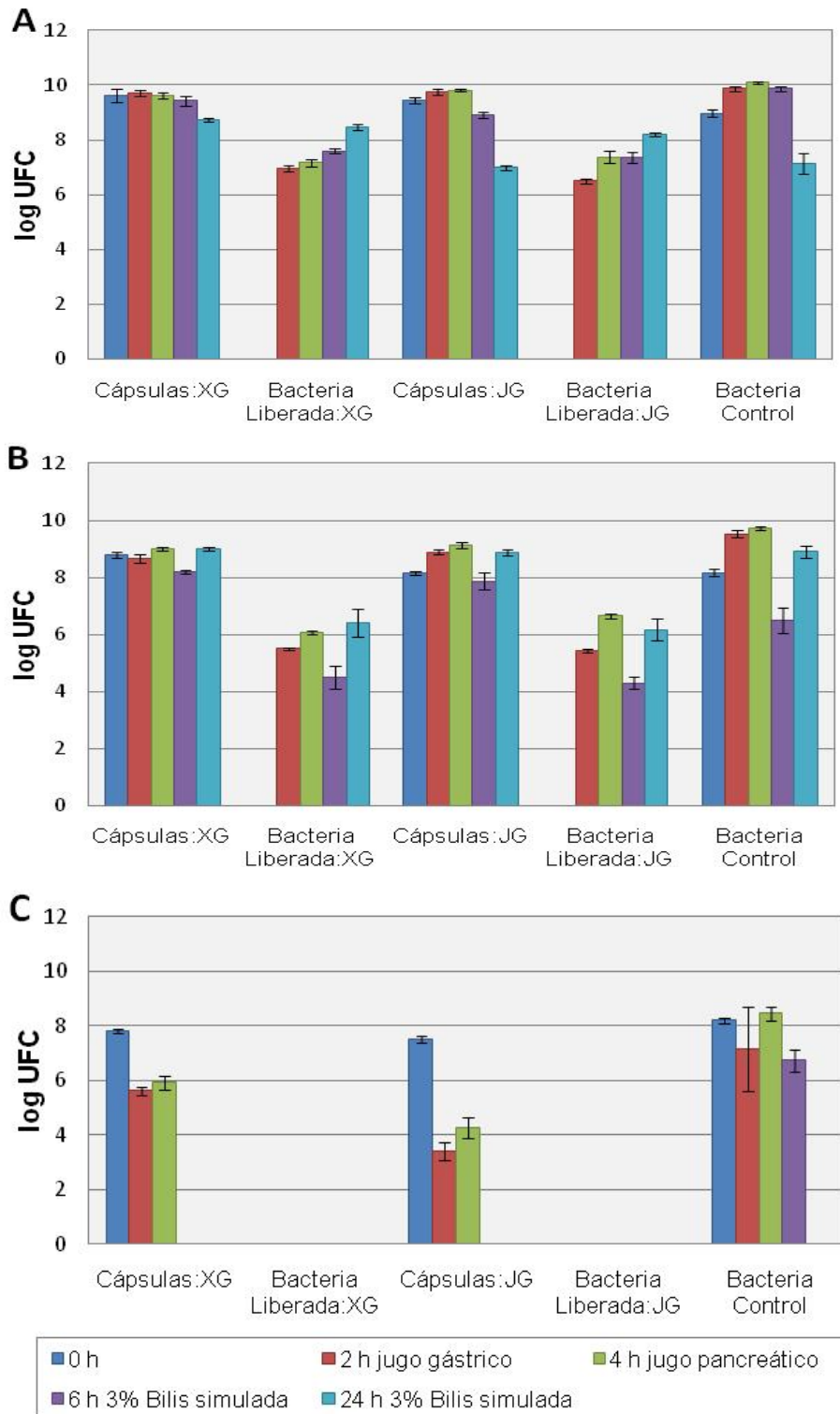


Fig. 49 Efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas en la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y sin encapsular con Xantano:Gelano (1%:0,75%)=XG y Jamilano:Gelano (1%:1%)=JG tras una exposición SECUENCIAL. A. *L. plantarum* CRL 1815; B. *L. rhamnosus* ATCC 53103; C. *B. longum* ATCC BAA-999

B. longum ATCC BAA-999, mostró una menor supervivencia frente a las condiciones gastrointestinales simuladas, registrándose un número menor cuando se encontraba encapsulada, fenómeno que ya se detectó en la exposición frente a diferentes pH (apartado 4.2.1). Este cepa inmovilizada no fue capaz de sobrevivir tras la exposición frente a bilis simulada, aunque tras 2 horas de exposición sin inmovilizar sí se mantuvo viable en el orden de 10^6 UFC/mL.

Los lactobacilos, sin embargo, fueron más resistentes a estas condiciones, registrándose supervivencia incluso tras 24 horas de exposición frente a bilis simulada. La incubación en bilis simulada fue la más agresiva, ya que se registraron mayores reducciones de la viabilidad. Dentro de los lactobacilos, *L. rhamnosus* ATCC 53103 resultó más sensible inicialmente a la bilis simulada, con unas reducciones significativas de entre 10^1 - 10^4 UFC tras 2 horas de exposición ($p < 0,05$), dependiendo de si se encontró en su forma inmovilizada o sin inmovilizar, de la metodología empleada y del tipo de polímeros empleados (Fig. 49.b y 50.b). Las mayores reducciones se observaron al ser inmovilizada con Jamilano:Gelano (1%:1%) y en las bacterias difundidas de las cápsulas al medio cuando no hubo exposición secuencial. A pesar de esta reducción, posteriormente esta cepa registró un crecimiento tras 24 horas de exposición en bilis simulada, al contrario que *L. plantarum* CRL 1815 que, encapsulada y sin encapsular, inicialmente resistió a la incubación con bilis simulada, pero tras 24 horas de exposición vio reducida significativamente su supervivencia hasta en 10^2 UFC/g en algunos casos ($p < 0,05$) (Fig. 49.a y 50.a).

A pesar de que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las metodologías empleadas (Secuencial y No secuencial) en *L. plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular así como cuando *L. rhamnosus* ATCC 53103 fue liberada al medio, la exposición secuencial presentó en términos generales un número de microorganismos mayor a la no secuencial. La excepción se encontró con *B. longum* ATCC BAA-999 encapsulado y *L. rhamnosus* ATCC 53103 sin inmovilizar, los cuales presentaron mayor número cuando la exposición no fue secuencial; incluso, en la exposición no secuencial, se detectó crecimiento cuando *B. longum* ATCC BAA-999 difundió de las perlas al jugo pancreático simulado. El hecho de que

mayoritariamente la exposición secuencial registrara mayores números puede ser debido a una adaptación de los microorganismos al estrés producido por estas condiciones, de manera que la exposición inicial al estrés ácido estimuló a los mecanismos de adaptación de estos microorganismos ante un entorno adverso (Sanz, 2007).

En cuanto al material empleado para la encapsulación, las cepas, inmovilizadas con Xantano:Gelano (1%:0,75%), presentaron una supervivencia significativamente superior que cuando se inmovilizaron con Jamilano:Gelano (1%:1%) ($p < 0,05$), incluso en el caso de *B. longum* ATCC BAA-999, cepa que presentó concentraciones muy pobres cuando fue inmovilizada.

La interacción de los factores estudiados (condiciones gastrointestinales simuladas, tipo de perlas y metodología empleada) también ejerció su influencia en ambas cepas de lactobacilos. La evaluación estadística de estas interacciones se detalla en la tabla 48.

Tabla 48. Influencia de los factores estudiados y sus interacciones sobre los microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular. Evaluación estadística.

		TGI	P	M	TGI:P	TGI:M	P:M	TGI:P:M
<i>L. plantarum</i> CRL 1815	Cápsulas	X	X		X	X	X	X
	Bacteria liberada	X	X	X	X	X		
	Bacteria control	X				X		
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	Cápsulas	X	X	X	X	X	X	X
	Bacteria liberada	X				X		X
	Bacteria control	X		X		X		
<i>B. longum</i> ATCC BAA-999	Cápsulas	X	X	X				
	Bacteria liberada	X						
	Bacteria control	X						

TGI: Condiciones gastrointestinales simuladas X: Existencia de Interacción
P: Material de encapsulación, Polímeros
M: Metodología

A la vista de estos resultados, se puede afirmar que la inmovilización ejerce un efecto protector frente a las condiciones gastrointestinales simuladas ensayadas en este trabajo ya que, con la excepción ya comentada de *B. longum* ATCC BAA-999, los microorganismos inmovilizados presentaron una supervivencia superior que cuando no lo estaban. Este efecto protector,

además, fue significativamente superior con las perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) en todos los casos, incluido *B. longum* ATCC BAA-999 ($p < 0,05$), especialmente tras la exposición de *L. plantarum* CRL 1815 frente a bilis simulada.

Es importante mencionar que los lactobacilos que difundieron de las perlas al medio se mantuvieron viables y fueron capaces de crecer bajo las condiciones gastrointestinales simuladas testadas, pero hay que tener en cuenta que el número de estas bacterias liberadas sólo se refería a cada condición individual, debido a las limitaciones de la metodología empleada en la cual se descartó el medio para pasar de una condición a otra. Sería de interés aplicar una metodología que permita evaluarlos de manera continua, permitiendo recoger los datos reales de liberación y crecimiento a lo largo de todo el ensayo, del tipo “gut-model” (Gibson & Fuller, 2000). Lo que se planteó en este trabajo de tesis fue emplear un modelo de experimentación *in vivo* para estudiar el comportamiento de las perlas de microorganismos probióticos en un entorno más complejo, próximo al tracto gastrointestinal humano, para una posterior aplicación en administración oral, aspecto que se abordó en el último gran bloque de la presente tesis.

4.2.4 Evaluación del efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas sobre el fenómeno de auto-agregación en microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular.

Una vez las cepas probióticas, encapsuladas y sin encapsular, se sometieron a las condiciones gastrointestinales simuladas, se ensayó el efecto que estas condiciones ejercieron sobre su capacidad de auto-agregación. Para ello, se prepararon suspensiones de los microorganismos en PBS hasta una absorbancia (A_{600}) que se ajustó a $0,60 \pm 0,05$, las cuales se dejaron sedimentar a temperatura ambiente durante 4 horas, realizando medidas a $\lambda = 600$ nm cada hora. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 49, 50, 51, 52, 53 y 54.

Tabla 49. Resultados de auto-agregación de *L. plantarum* CRL 1815 sin encapsular.

<i>L.plantarum</i> CRL 1815		% Auto-agregación			
		1h	2h	3h	4h
Sin encapsular		2,69±1,21	4,60±0,33	7,95±1,55	11,13±0,67
Sin encapsular- Secuencial	Jugo gástrico simulado	1,68±1,41	4,58±0,74	7,14±1,82	11,54±1,77
	Jugo pancreático simulado	1,63±0,30	4,07±0,18	6,84±1,58	10,66±0,19
	Bilis simulada (2h)	2,23±0,73	3,88±0,06	5,95±0,60	10,65±0,93
	Bilis simulada (24h)	3,13±2,44	5,62±2,72	7,95±2,13	10,62±1,15
Sin encapsular- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	1,15±0,20	3,39±1,25	6,02±1,51	9,88±1,66
	Jugo pancreático simulado	1,38±0,14	3,81±0,21	6,46±0,50	10,41±0,25
	Bilis simulada (2h)	1,76±0,46	3,31±1,32	6,35±1,30	10,27±0,58
	Bilis simulada (24h)	1,48±0,21	3,78±0,22	6,76±0,89	10,96±0,47
* Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al control sin exponer en cada tiempo					

Tabla 50. Resultados de auto-agregación de *L. rhamnosus* ATCC 53103 sin encapsular.

<i>L.rhamnosus</i> ATCC 53103		% Auto-agregación			
		1h	2h	3h	4h
Sin encapsular		4,28±0,07	8,53±0,68	12,19±1,14	17,60±1,27
Sin encapsular- Secuencial	Jugo gástrico simulado	2,80±0,02*	7,79±1,75	11,65±0,50	17,58±0,36
	Jugo pancreático simulado	0,93±0,18*	7,10±1,38	10,54±2,75	15,73±3,63
	Bilis simulada (2h)	0,52±0,11*	7,97±0,52	11,98±2,81	16,34±1,45
	Bilis simulada (24h)	2,80±1,93	7,93±0,52	11,42±0,14	14,14±2,10
Sin encapsular- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	4,65±3,66	8,16±5,18	9,79±6,89	16,05±5,34
	Jugo pancreático simulado	2,79±2,21	4,60±0,82*	7,46±2,14	14,43±3,58
	Bilis simulada (2h)	1,49±0,05*	5,47±0,28	7,86±0,74	14,49±1,94
	Bilis simulada (24h)	2,07±0,28	6,03±1,73	9,16±1,88	15,84±0,06
* Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al control sin exponer en cada tiempo					

Tabla 51. Resultados de auto-agregación de *B. longum* ATCC BAA-999 sin encapsular.

<i>B. longum</i> ATCC BAA-999		% Auto-agregación			
		1h	2h	3h	4h
Sin encapsular		4,44±0,74	9,41±0,10	12,48±0,95	16,30±1,00
Sin encapsular- Secuencial	Jugo gástrico simulado	3,78±0,49	7,30±0,98	9,30±1,74	12,11±1,45
	Jugo pancreático simulado	4,38±0,63	8,88±0,62	11,18±0,31	14,04±0,55
	Bilis simulada (2h)	2,80±1,03	5,82±1,51	9,37±2,81	12,01±2,51
Sin encapsular- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	3,59±1,67	8,40±0,56	10,54±0,37	13,17±1,32
	Jugo pancreático simulado	3,88±1,07	7,47±0,56	10,69±0,54	13,92±0,76
	Bilis simulada (2h)	3,43±2,73	5,17±4,89	10,31±1,84	13,30±0,96

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al control sin exponer en cada tiempo

Como se detalló en el apartado anterior (4.2.3), no se registró supervivencia con *B. longum* ATCC BAA-999 en bilis simulada en algunas ocasiones. Dado que la supervivencia de los microorganismos es el punto de partida del presente estudio, sólo se pudo estudiar su auto-agregación en las condiciones en las que sí se obtuvieron bacterias viables y son las que se detallan en las correspondientes tablas.

En cuanto a los microorganismos encapsulados, luego de que fueron sometidos al paso por las condiciones gastrointestinales simuladas, se analizó su capacidad de auto-agregación una vez liberados de las perlas. También se analizó esta propiedad en los microorganismos que difundieron de las perlas al medio al final del estudio, es decir, tras 24 horas en bilis simulada (Bilis simulada (24h)- Sobrenadante). En todos los casos los resultados obtenidos se compararon con un control en el cual se determinó la capacidad de auto-agregación de las diferentes cepas, tanto encapsuladas como sin encapsular, sin que hayan sido sometidas a ninguna condición gastrointestinal simulada.

Tabla 52. Resultados de auto-agregación de *L. plantarum* CRL 1815 encapsulado

<i>L.plantarum</i> CRL 1815		% Auto-agregación			
		1h	2h	3h	4h
Xantano: Gelano					
Liberado de la cápsula		2,03±0,27	4,52±0,97	7,96±2,32	13,79±2,47
Encapsulado-Secuencial	Jugo gástrico simulado	1,13±0,01	2,88±0,62	6,25±1,34	9,89±0,24
	Jugo pancreático simulado	2,84±1,84	2,76±1,89	6,26±1,49	9,72±1,66
	Bilis simulada (2h)	1,84±0,31	7,55±5,67	6,57±0,24	10,95±0,09
	Bilis simulada (24h)	2,00±0,06	2,34±1,02	5,04±1,77	8,85±1,47
	Bilis simulada (24h)-Sobrenadante	0,95±0,62	3,42±2,23	5,90±1,33	10,51±1,42
Encapsulado-No Secuencial	Jugo gástrico simulado	0,86±0,21	3,42±0,40	7,12±1,35	10,28±0,17
	Jugo pancreático simulado	0,50±0,29*	3,34±0,33	5,74±0,16	11,71±0,73
	Bilis simulada (2h)	2,68±0,73	4,49±0,69	6,66±0,60	10,58±0,10
	Bilis simulada (24h)	3,50±3,17	3,22±1,15	6,12±1,10	10,85±2,82
	Bilis simulada (24h)-Sobrenadante	1,71±1,01	2,51±0,35	5,65±1,05	10,74±0,00
Jamilano: Gelano					
Liberado de la cápsula		2,03±0,31	4,37±0,96	7,68±0,86	11,36±0,69
Encapsulado-Secuencial	Jugo gástrico simulado	1,65±1,05	3,63±0,08	5,34±0,97	8,69±0,89
	Jugo pancreático simulado	1,79±0,45	4,09±0,44	7,08±0,42	9,53±1,08
	Bilis simulada (2h)	2,14±0,11	5,11±0,29	7,59±0,39	11,31±1,59
	Bilis simulada (24h)	2,72±0,67	4,66±0,24	6,91±0,80	10,22±1,40
	Bilis simulada (24h)-Sobrenadante	1,28±0,60	4,11±0,37	6,51±1,51	13,83±6,52
Encapsulado-No Secuencial	Jugo gástrico simulado	1,34±0,77	4,82±0,50	8,34±1,08	10,04±0,92
	Jugo pancreático simulado	1,42±0,46	1,27±2,90	8,00±3,31	11,37±2,09
	Bilis simulada (2h)	1,17±0,40	3,55±0,60	6,32±0,77	10,80±1,55
	Bilis simulada (24h)	1,62±1,02	3,88±1,30	6,46±1,05	8,74±2,14
	Bilis simulada (24h)-Sobrenadante	3,14±1,81	4,94±0,92	8,31±0,06	16,34±5,79
* Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al control sin exponer en cada tiempo					

Tabla 53. Resultados de auto-agregación de *L. rhamnosus* ATCC 53103 encapsulado

<i>L.rhamnosus</i> ATCC 53103 Xantano: Gelano		% Auto-agregación			
		1h	2h	3h	4h
Liberado de la cápsula		3,66±1,85	9,10±0,74	12,61±0,52	17,49±0,83
Encapsulado- Secuencial	Jugo gástrico simulado	4,96±1,37	11,69±2,74	16,83±6,28	19,91±5,45
	Jugo pancreático simulado	2,90±2,41	5,05±3,82	10,09±0,82	13,40±2,59
	Bilis simulada (2h)	3,97±1,34	7,02±0,06	14,14±0,05*	15,98±1,14
	Bilis simulada (24h)	0,51±0,38	4,89±1,27	9,11±0,49	10,87±1,67
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	5,03±6,23	6,54±0,98	10,30±2,90	11,60±3,37
Encapsulado- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	3,36±0,61	4,82±2,67	7,74±2,81	15,57±1,84
	Jugo pancreático simulado	2,32±2,07	7,46±0,07	11,14±0,23	15,67±0,98
	Bilis simulada (2h)	2,91±1,30	8,10±0,61	14,45±1,88	14,94±5,10
	Bilis simulada (24h)	1,52±1,31	4,00±0,48*	10,10±2,33	12,19±1,74
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	5,53±1,02	9,67±1,93	10,73±2,58	14,13±1,15
Jamilano: Gelano					
Liberado de la cápsula		3,02±0,33	5,35±1,91	9,80±0,24	13,48±1,10
Encapsulado- Secuencial	Jugo gástrico simulado	1,28±0,81	5,30±0,46	10,17±1,91	13,83±0,39
	Jugo pancreático simulado	2,02±0,62	5,33±0,78	8,64±0,51	11,73±0,92
	Bilis simulada (2h)	1,09±0,08	6,24±0,83	10,43±0,38	14,37±0,84
	Bilis simulada (24h)	2,70±0,73	7,50±1,02	15,00±1,65	18,06±1,25
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	1,89±0,06	4,63±0,15	11,02±3,65	15,39±6,64
Encapsulado- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	2,30±3,09	6,40±1,93	10,67±0,04	14,78±0,48
	Jugo pancreático simulado	1,63±1,29	6,11±1,87	10,33±0,90	14,25±0,06
	Bilis simulada (2h)	1,58±0,24	6,06±0,42	9,87±0,69	13,24±0,22
	Bilis simulada (24h)	4,57±2,08	8,05±3,91	12,33±2,65	16,46±0,03
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	3,91±1,82	8,56±4,36	13,23±2,11	18,26±3,51

* Diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto al control sin exponer en cada tiempo

Tabla 54. Resultados de auto-agregación de *B. longum* ATCC BAA-999 encapsulado

<i>B. longum</i> ATCC BAA-999. Xantano: Gelano		% Auto-agregación			
		1h	2h	3h	4h
Liberado de la cápsula		1,94±1,00	7,60±0,19	10,40±1,32	14,76±1,99
Encapsulado- Secuencial	Jugo gástrico simulado	1,28±1,41	3,88±1,56	8,24±2,52	11,99±3,42
	Jugo pancreático simulado	4,85±2,49	7,26±2,00	13,25±2,01	17,09±3,74
Encapsulado- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	2,53±0,56	3,66±0,19*	5,99±0,81*	7,27±1,25*
	Jugo pancreático simulado	6,16±2,34	8,82±0,62	13,88±2,91	17,18±3,18
Jamilano: Gelano					
Liberado de la cápsula		5,12±0,50	9,46±0,18	10,28±0,37	15,58±0,83
Encapsulado- Secuencial	Jugo gástrico simulado	2,79±1,91	8,63±1,06	12,21±2,57	16,14±3,31
	Jugo pancreático simulado	6,20±0,21	10,70±0,64	15,29±2,65	17,87±0,52
Encapsulado- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	4,89±3,25	9,96±4,25	13,33±3,51	14,40±3,83
	Jugo pancreático simulado	3,84±2,56	9,88±2,08	13,62±2,23	17,80±1,74

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al control sin exponer en cada tiempo

Los microorganismos sin encapsular, tras crecer en las correspondientes condiciones ensayadas, mostraron una tendencia general a reducir su capacidad de auto-agregación tras su exposición al jugo pancreático simulado y especialmente a la bilis simulada. Si bien luego de 4 horas estas diferencias no fueron significativas, en las primeras mediciones (1-2 h) sí se registraron diferencias estadísticamente significativas en *L. rhamnosus* ATCC 53103 ($p < 0,05$).

Cuando estas mismas cepas estuvieron inmovilizadas en Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) mostraron un comportamiento similar en cuanto a la disminución de la capacidad de auto-agregación, sobre todo frente a bilis simulada. En particular, en los lactobacilos inmovilizados se detectó una mayor auto-agregación en los casos en que la bacteria difundió al medio y se expuso a la bilis simulada (Bilis simulada (24h)-Sobrenadante) que cuando se mantuvo dentro de las perlas en las mismas condiciones de exposición, con la excepción de *L. rhamnosus* ATCC 53103

inmovilizada en Jamilano:Gelano (1%:1%) en el caso de la metodología secuencial. Del mismo modo, a excepción de *B. longum* ATCC BAA-999 inmovilizado en Xantano:Gelano (1%:0,75%) tras la exposición frente a jugo gástrico simulado en la metodología no secuencial, todas las medidas realizadas a las 4 horas no revelaron diferencias estadísticamente significativas en relación a los controles de cada cepa ($p>0,05$).

En cuanto al efecto que cada uno de los polímeros pudo ejercer sobre esta prueba, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre resultados obtenidos con ambos ($p>0,05$). A pesar de ello, sí se observó, especialmente con *L. plantarum* CRL 1815 y *L. rhamnosus* ATCC 53103, un aumento de los valores de auto-agregación a las 4 horas por encima del control cuando las cepas estuvieron inmovilizadas con Jamilano:Gelano (1%:1%). Se debe resaltar que el empleo de la metodología secuencial o no secuencial en el estudio de supervivencia (apartado 4.2.3) no influyó directamente en la capacidad de auto-agregarse de ninguna de las tres cepas estudiadas ($p>0,05$).

Para evidenciar los efectos beneficiosos a nivel gastrointestinal, es preferible que los microorganismos probióticos sean capaces de auto-agregar con el fin de alcanzar la cantidad de masa adecuada para que, junto con la adherencia al epitelio intestinal, puedan actuar como barrera frente a la colonización de patógenos (Collado, *et al.*, 2008). Igualmente se ha relacionado esta propiedad con un efecto protector de la vagina humana, ya que unido con la capacidad de adhesión a las células del epitelio vaginal, pueden promover la formación de biofilm de lactobacilos en el epitelio vaginal que previene el ingreso de patógenos (Juarez Tomas, *et al.*, 2005).

Este efecto protector de los epitelios frente a patógenos, como se ha descrito, está siempre relacionado con la capacidad de adhesión de los microorganismos benéficos. Del Re, *et al.* (2000) describieron una correlación entre auto-agregación y adhesión, de manera que las cepas que no eran capaces de auto-agregar, tampoco lo podrían adherirse a células. De hecho, las que presentaron un mayor porcentaje de adhesión fueron aquellas que presentaron valores de auto-agregación intermedios (10-80%, principalmente en torno a 50%).

Por otro lado, Gómez Zavaglia, *et al.* (2002) estudiaron el efecto de la bilis sobre propiedades superficiales de bifidobacterias, entre ellas la auto-agregación, encontrando que las bifidobacterias sometidas a un shock frente a bilis (5 g/L), pero sobre todo las cultivadas en medio con bilis añadida (1 g/L), disminuyeron su capacidad de auto-agregación, posiblemente debido a cambios metabólicos que afectaron a los componentes azucarados de las membranas (glicolípidos) y que por tanto llevaron también a modificaciones en el potencial zeta.

Esta disminución de la auto-agregación tras la exposición frente a bilis se observó en nuestros resultados, aunque también se observó un incremento de la auto-agregación cuando los lactobacilos se inmovilizaron en Jamilano: Gelano (1%:1%). Estos resultados pueden explicarse por un efecto de tipo protector por parte de este material de inmovilización, pero al haber sido las cepas de nuestro estudio expuestas a concentraciones de bilis muy superiores a las estudiadas por Gómez Zavaglia *et al.* (2002), los resultados obtenidos no son concluyentes.

Por otro lado, no podemos afirmar categóricamente que la exposición a las condiciones gastrointestinales simuladas afecta a la capacidad de auto-agregación de las tres cepas probióticas estudiadas, puesto que no se encontraron diferencias significativas evidentes de este hecho ($p > 0,05$). Estos resultados son positivos, ya que permitirían que estas cepas probióticas lleguen al epitelio intestinal con la capacidad de auto-agregación inalterada y ejerzan su acción protectora. En este trabajo de tesis no se realizaron estudios de adhesión a líneas celulares *in vitro*, pero sería un área interesante de encarar en investigaciones futuras.

4.2.5 Evaluación del efecto de las condiciones gastrointestinales simuladas sobre la producción de peróxido de hidrógeno en microorganismos probióticos encapsulados y sin encapsular.

Luego de someter a los microorganismos probióticos, encapsulados y sin encapsular, a las condiciones gastrointestinales simuladas, se evaluó el

efecto que estas condiciones ejercieron sobre la producción de peróxido de hidrógeno de los mismos. La producción de peróxido de hidrógeno se evaluó mediante el *método cualitativo en placas de agar*, en el cual los microorganismos se sembraron en placas de MRS agar adicionado de TMB y de la enzima peroxidasa. Si los microorganismos son capaces de producir H_2O_2 , la peroxidasa va a producir O_2 a partir de ese H_2O_2 y el TMB, por tanto, va a teñir las colonias de azul. Por tanto, tras 48 horas de incubación en las condiciones correspondientes las colonias que produzcan H_2O_2 aparecerán de color azul o marrón y las no productoras presentarán el color característico colonial de cada cepa en particular. La intensidad de color permitió clasificar las cepas probióticas como altamente productoras (++) , productoras (+) y no productoras (-). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 55 y 56.

Tabla 55. Producción de peróxido de hidrógeno de las cepas probióticas sin encapsular

		<i>L.plantarum</i> CRL 1815	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	<i>B. longum</i> ATCC BAA-999
Sin encapsular		-	+	-
Sin encapsular- Secuencial	Jugo gástrico simulado	-	+	-
	Jugo pancreático simulado	-	+	-
	Bilis simulada (2h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)	-	-	-
Sin encapsular- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	-	+	-
	Jugo pancreático simulado	-	+	-
	Bilis simulada (2h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)	-	+	-

En este caso se analizaron las mismas condiciones que en el estudio de auto-agregación, en el sentido que al no haberse registrado supervivencia con *B. longum* ATCC BAA-999 en bilis simulada en algunas ocasiones en el estudio de supervivencia (apartado 4.2.3) y al haber sido éste el punto de partida del presente estudio, sólo se pudo estudiar la producción de H_2O_2 en las condiciones en las que sí se obtuvieron microorganismos viables. De igual modo, se analizó la producción de H_2O_2 tras las liberación de los microorganismos de las perlas así como también luego de su difusión de las

perlas al medio al final del estudio, es decir, tras 24 horas en bilis simulada (Bilis simulada (24h)- Sobrenadante). En todos los casos se determinó la producción de H₂O₂ de las diferentes cepas, tanto encapsuladas como sin encapsular, sin que hayan sido sometidas a ninguna condición gastrointestinal simulada.

Tabla 56. Producción de peróxido de hidrógeno de las cepas probióticas encapsuladas.

Bacteria encapsulada		<i>L. plantarum</i> CRL 1815	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	<i>B. longum</i> ATCC BAA-999
Xantano: Gelano				
Liberado de la cápsula		-	+	-
Encapsulado- Secuencial	Jugo gástrico simulado	-	+	-
	Jugo pancreático simulado	-	+	-
	Bilis simulada (2h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	-	+	-
Encapsulado- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	-	+	-
	Jugo pancreático simulado	-	+	-
	Bilis simulada (2h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	-	+	-
Jamilano: Gelano				
Liberado de la cápsula		-	+	-
Encapsulado- Secuencial	Jugo gástrico simulado	-	+	-
	Jugo pancreático simulado	-	+	-
	Bilis simulada (2h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	-	-	-
Encapsulado- No Secuencial	Jugo gástrico simulado	-	+	-
	Jugo pancreático simulado	-	+	-
	Bilis simulada (2h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)	-	+	-
	Bilis simulada (24h)- Sobrenadante	-	-	-

De las tres cepas probióticas estudiadas, *L. plantarum* CRL 1815 y *B. longum* ATCC BAA-999 no produjeron H_2O_2 y se mantuvieron como no productores, independientemente de la condición a la que fueron expuestos (Figura 51). Sólo *L. rhamnosus* ATCC 53103 fue débilmente productora de H_2O_2 , propiedad que mantuvo en casi todos los casos luego la exposición frente a condiciones gastrointestinales simuladas. Sin embargo, tras la exposición a bilis simulada durante 24 horas en la metodología secuencial sin inmovilizar y de la bacteria difundida al medio de las perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%), se perdió esa capacidad productora.

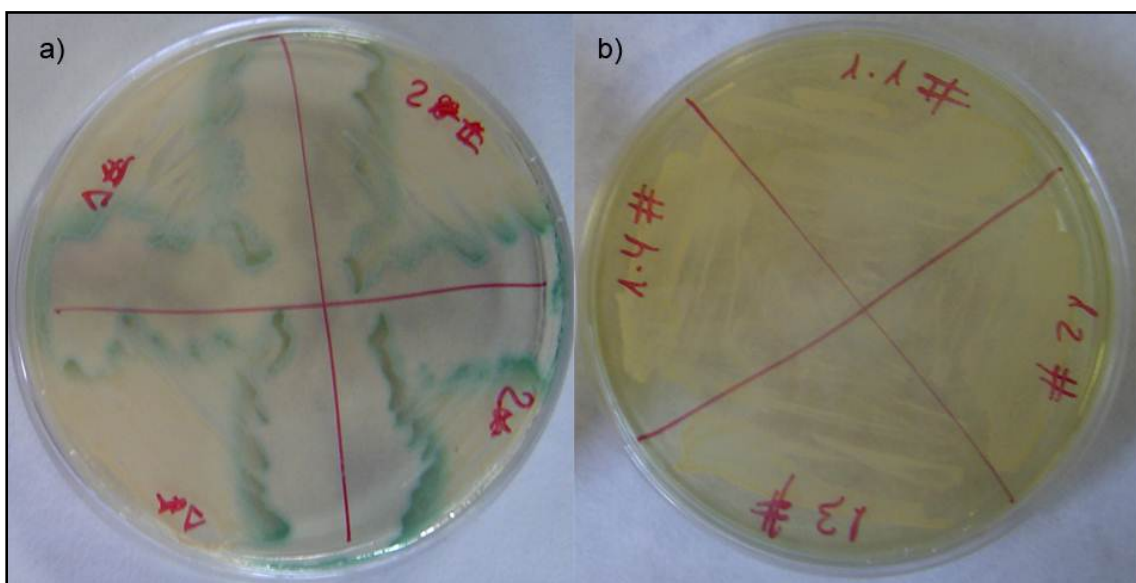


Fig. 51 Bacterias productoras (a) y no productoras (b) de peróxido de hidrógeno. a) *L. rhamnosus* ATCC 53103 b) *L. plantarum* CRL 1815

Algunas bacterias del ácido láctico (LAB) son capaces de producir sustancias del tipo bacteriocinas o H_2O_2 , capaces de inhibir el crecimiento de patógenos potenciales (Pascual, *et al.*, 2008), propiedades muy interesantes si lo que se pretende con su administración es ejercer un efecto beneficioso tanto a nivel gastrointestinal como vaginal, en que pueden inhibir a patógenos que potencialmente pueden colonizar y causar patologías (por ejemplo *Clostridium difficile* y *Candida albicans* en tracto gastrointestinal y vaginal, respectivamente).

Igualmente, se han descrito LAB capaces de producir H_2O_2 sin crecer y almacenadas en refrigeración, lo que ayudaría a aumentar la vida media de algunos alimentos refrigerados sin alterar la acidez de los productos (Zalan, *et*

al., 2005). Esto resulta muy útil en el caso de que el vehículo de administración de los microorganismos probióticos sea algún alimento, tipo yogurt, que necesita ser refrigerado durante su almacenamiento hasta su consumo.

Sin embargo, la capacidad productora de H₂O₂ va a estar muy ligada a las condiciones de cultivo, como el medio empleado para el crecimiento de la bacteria (Zalan, *et al.*, 2005) o la aireación utilizada (Pridmore, *et al.*, 2008). De ahí que se planteara el estudio a través de las diferentes condiciones gastrointestinales. Como se ha descrito anteriormente, sólo *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) fue productora de H₂O₂ y, a la vez, fue también la única que experimentó un cambio en esta producción a consecuencia de la exposición a una de estas condiciones gastrointestinales simuladas, en concreto, bilis simulada durante 24 horas en la metodología secuencial sin inmovilizar y de la bacteria difundida al medio de las perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%). Este cambio resultó en una pérdida de la capacidad de producción de H₂O₂.

Las condiciones de cultivo fueron idénticas en todos los casos y todas las réplicas, por lo que este factor quedaría descartado como agente causal de este comportamiento. Por otro lado, a pesar de que al crecer en bilis sólo se dio esta ausencia de producción de H₂O₂ cuando se empleó la metodología secuencial, cuando estuvo inmovilizado en Jamilano:Gelano (1%:1%) se dio este hecho con ambas metodologías, por lo que tampoco podemos adjudicar este comportamiento a una modificación en el metabolismo microbiano como consecuencia de su adaptación al paso por todas las condiciones adversas gastrointestinales simuladas. Tampoco puede deberse única y exclusivamente a la inmovilización o a la exposición prolongada a bilis simulada, puesto que con Xantano:Gelano (1%:0,75%) no se modificó esta producción en ningún caso. Por lo tanto, se debería realizar un estudio en profundidad sobre el efecto que la inmovilización en Jamilano:Gelano (1%:1%) y el crecimiento en bilis simulada pueden ejercer sobre el metabolismo de esta cepa para que se inhiba la producción de H₂O₂.

Por último, al ser *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) productora de H₂O₂ puede ser considerada de interés para el desarrollo de productos que tengan como fin la aplicación clínica para la prevención o el tratamiento de enfermedades infecciosas con etiología bacteriana a nivel de los tractos gastrointestinal y vaginal.

4.3 Efecto de la encapsulación de microorganismos probióticos en estudios *in vivo* administrados por vía oral.

El objetivo de los estudios en sistemas *in vivo*, es evaluar si la inmovilización de microorganismos probióticos en los diferentes materiales de encapsulación empleados en este trabajo es efectiva en la protección de las cepas probióticas en su paso a través del tracto gastrointestinal. Por ello, se decidió continuar la investigación en base a la determinación del comportamiento de los diferentes materiales de encapsulación para cumplir este cometido. Debido a ello y al carácter preliminar de estos estudios, se decidió continuar a partir de esta etapa con una sola cepa probiótica.

La cepa se seleccionó en base a los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* previamente descritos. En este sentido, *L. plantarum* CRL 1815 fue la que presentó mejores resultados de supervivencia a lo largo del tiempo, de resistencia a diferentes pH con ambos materiales de encapsulación así como también evidenció un buen perfil de resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas, con una buena tolerancia a bilis. De este modo, *L. plantarum* CRL 1815 fue seleccionada la cepa a testar *in vivo*, inmovilizada en los dos tipos de materiales de encapsulación empleados hasta el momento, Xantano:Gelano (0,75%:1%) y Jamilano:Gelano (1%:1%).

Los ensayos *in vivo* incluyeron estudios de la capacidad de colonización y de tránsito intestinal, del impacto de la administración de las cepas probióticas inmovilizadas sobre los principales grupos microbianos fecales y de linfoproliferación en respuesta a mitógenos, con el fin de evaluar la respuesta biológica de los animales luego de la administración oral de los microorganismos.

Dado que el estudio del impacto de la administración de las cepas probióticas inmovilizadas sobre los principales grupos microbianos fecales se llevó a cabo en el Department of Food and Nutritional Sciences de la Universidad de Reading (Reino Unido) y para optar a la obtención del doctorado con mención europea, el capítulo de resultados 4.3.1 sobre “Evaluación del impacto de la administración de *L.plantarum* CRL 1815

encapsulado y sin encapsular sobre la microbiota fecal de las ratas mediante FISH” se ha elaborado en inglés.

4.3.1 Effect of free and encapsulated *L.plantarum* CRL 1815 on rat faecal microbiota composition.

Both, encapsulated and non-encapsulated bacteria, as well as beads prepared without probiotic bacteria with the two wall materials employed during this study, Xanthan:Gellan gum (0.75%:1%) and Jamilan:Gellan gum (1%:1%), were orally administered daily to Wistar rats throughout a 10 days study. Briefly, the details of the experiment are detailed below:

	Wall material tests	
	Xanthan:Gellan gum test	Jamilan:Gellan gum test
Test duration	10 days	10 days
Probiotic strain	<i>L. plantarum</i> CRL 1815	<i>L. plantarum</i> CRL 1815
Wall materials	1%Xanthan gum+0.75%Gellan gum	1%Gellan gum+1%Jamilan
Samples analysed	Faeces: days 1,3,7,10	Faeces: days 1,3,7,10

FISH analysis was used to monitor the changes in faecal microbiota as a consequence of the oral administration of *L. plantarum* CRL 1815, immobilized or not, and the polymers employed as wall materials. Due to the complexity of the digestive tract ecosystem, this kind of analysis has been chosen over conventional culture, as this molecular probing approach is rapid, specific and applicable to mixed cultured. Also allows determining those bacteria that are difficult to culture or even uncultured. Furthermore, FISH technique has been shown at least as accurate as conventional cultivation methods in the quantification of predominant groups of anaerobic bacteria in human faecal samples (Apostolou, *et al.*, 2001).

A total of 11 probes were used for bacterial enumeration, all of them targeted to human faecal species. *Bacteroides* species could not be studied as the Bac303 probe, commonly used to target *Bacteroides* and *Prevotella* species in humans and animals, because failed to distinguish hybridized cells in our rat faecal samples. This problem was previously detected for canine faecal

samples due to background fluorescence (Jia, *et al.*, 2010). Other probes for this bacterial group were not tested, however it must be said that with the probes employed it has been detected around 80% of the faecal population of certain samples. The probes used in this study and their corresponding targeted groups are summarized below (Table 57):

Table 57. FISH probes employed in this study

Probe name	Sample dilution	Target organism
Ato291	50	<i>Atopobium</i> cluster
Bif164	10-50	<i>Bifidobacterium</i> group
Chis150	50	<i>Clostridium histolyticum</i> group
Clit135	50	<i>Clostridium lituseburense</i> group
Ecy1387	50	<i>Eubacterium cylindroides</i> group
Erec482	100	<i>Clostridium coccooides-Eubacterium rectale</i> group
Eub338‡		
Eub338II‡	1000	Total bacteria
Eub338III‡		
Fpra655	50	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> cluster
Lab158	10-50	<i>Lactobacillus-Enterococcus</i> group
Prop853	100	Clostridial cluster IX
Rbro730§/ Rfla729§	50	<i>Ruminococcus</i> group

‡All three probes used together at equimolar concentrations.
§Both probes used together at equimolar concentrations.

With these probes, the absolute numbers of bacteria per gram of faeces were obtained, but also different proportions of each bacterial group relative to total bacteria (recovered by using the Eub338 probes) were calculated and expressed as a percentage of total bacteria.

Cell counts of the samples performed by FISH are summarized in tables 58 y 59 and graphs showing the numbers of bacteria per gram of faeces evolution during the studies were also performed (Figures 52 and 53).

Table 58. Modifications of the fecal microbial population after the administration of 1%Xanthan gum+0,75%Gellan gum beads with *L.plantarum* CRL 1815

Probes	Beads (C.V.)*				<i>L.plantarum</i> CRL 1815 (B.)*				Beads with <i>L.plantarum</i> CRL 1815 (C.B.)*				Control (T.)*			
	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10
Eub338																
Eub338II	10.80±0.00	10.86±0.16	10.89±0.17	10.91±0.21	10.64±0.16 ^b	10.94±0.13 ^a	10.87±0.11	10.69±0.28	10.51±0.19	10.85±0.16	10.65±0.01 ^d	10.92±0.11 ^c	10.45±0.18	10.78±0.10	10.78±0.09	10.91±0.10
Eub338III†																
Ato291	9.08±0.00 ^{C,D†}	9.11±0.23	9.02±0.12	9.12±0.16	9.17±0.02 ^B	9.31±0.11	9.15±0.10	9.25±0.18	9.21±0.00 ^B	9.11±0.08	9.10±0.13	9.14±0.14	9.22±0.06	8.88±0.40	9.22±0.11	9.24±0.11
Bif164	8.31±0.00 ^b	6.85±0.67 ^a	7.40±0.75	7.33±0.79	8.80±0.38	7.94±0.48	7.75±0.20	7.58±0.67	8.63±0.68	8.02±0.49	7.51±0.48	7.44±0.48	8.91±0.39	7.83±0.53	7.36±0.14	7.78±0.24
Chis150	9.30±0.00	9.53±0.13 ^A	9.61±0.17	9.61±0.20	9.39±0.04	9.30±0.33	9.38±0.04 ^A	9.25±0.43	9.53±0.04 ^d	9.62±0.07 ^{d,A}	9.43±0.08 ^A	9.32±0.15 ^{a,b}	9.45±0.09	9.85±0.05 ^{c,B,D}	9.68±0.02 ^{b,C,D}	8.78±0.51
Clit135	8.51±0.00	8.91±0.16 ^{A,D}	9.14±0.05 ^{d,A,D}	8.83±0.07 ^c	8.58±0.03	9.11±0.31	8.88±0.38	8.99±0.12	8.62±0.04 ^{b,c}	9.18±0.03 ^{a,c,d,B}	8.88±0.03 ^{a,b,B}	8.88±0.10 ^b	8.78±0.21	9.17±0.05 ^{c,B}	8.82±0.12 ^{b,B}	8.79±0.06
Ecy1387	9.24±0.00	9.03±0.25	8.93±0.48	8.85±0.21	9.03±0.17	8.99±0.21	8.63±0.45	8.69±0.27	9.34±0.11	9.22±0.20	8.55±0.26	8.92±0.25	9.31±0.12	8.95±0.16	8.96±0.21	8.78±0.17
Erec482	9.61±0.00	9.84±0.15 ^D	10.01±0.41	9.98±0.28	9.63±0.04 ^C	9.86±0.24	9.66±0.19 ^{a,A}	9.93±0.31	9.59±0.03	9.58±0.08 ^B	10.01±0.24	10.04±0.18	9.71±0.08	9.61±0.18 ^C	10.17±0.10 ^{b,C}	10.05±0.34
Fpra655	9.20±0.00 ^C	8.98±0.34	8.87±0.08 ^a	8.87±0.35	9.29±0.16	9.08±0.35	8.94±0.25	8.96±0.17	9.28±0.13	8.65±0.21	8.64±0.46	8.57±0.43	9.28±0.06 ^C	8.71±0.30	8.67±0.14 ^a	8.66±0.19
Lab158	9.37±0.00	9.18±0.43	9.36±0.28 ^C	9.03±0.27	9.30±0.04 ^C	9.41±0.02 ^{c,d,A,D}	8.66±0.05 ^{a,b,A,B}	8.73±0.19 ^{b,D}	9.38±0.23	8.85±0.30 ^C	8.81±0.09 ^A	9.26±0.13 ^C	8.97±0.22	8.58±0.31 ^{C,C}	9.19±0.09 ^{b,C,D}	8.78±0.42
Prop853	9.64±0.00	9.60±0.55	9.88±0.30	9.82±0.39	9.43±0.31	9.87±0.06 ^c	9.51±0.19 ^b	9.80±0.20	9.58±0.02	9.82±0.36	9.77±0.39	9.72±0.34	9.63±0.03	9.80±0.08	9.90±0.22	9.89±0.05
Rbro730/ Rfla729§	9.42±0.00	9.59±0.53	9.56±0.44	9.59±0.30	9.52±0.31	9.79±0.33	9.20±0.08 ^A	9.44±0.27	9.39±0.12	9.53±0.25	9.26±0.39	9.59±0.18	9.47±0.07	9.58±0.17	9.73±0.05 ^C	9.57±0.40

*The values are means ± standard errors of the means (n=4)

† Legend:

(P-value<0.05)

- a Significant difference from time point 1;
- b Significant difference from time point 3;
- c Significant difference from time point 7;
- d Significant difference from time point 10;

- A Significant difference with the control
- B Significant difference with the beads
- C Significant difference with the bacteria
- D Significant difference with the bacteria encapsulated

Table 59. Modifications of the fecal microbial population after the administration of 1%Gellan gum+1% Jamilan beads with *L.plantarum* CRL 1815

Probes	Beads (C.V.)*				<i>L.plantarum</i> CRL 1815 (B.)*				Beads with <i>L.plantarum</i> CRL 1815 (C.B.)*				Control (T)*			
	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10	Day 1	Day 3	Day 7	Day 10
Eub338																
Eub338II	11.12±0.08 ^C	10.80±0.20	10.54±0.26	10.57±0.14	10.89±0.23 ^B	10.53±0.20	10.77±0.18	10.68±0.13	10.73±0.13	10.87±0.13	10.86±0.08	10.86±0.17	10.88±0.07	10.73±0.15	10.70±0.04	10.87±0.11
Eub338III†																
Ato291	9.28±0.08	9.08±0.14 ^{D†}	9.31±0.10	9.42±0.03 ^D	9.27±0.01	9.20±0.18	9.18±0.23	9.37±0.06 ^D	9.18±0.12	9.34±0.05 ^B	9.24±0.07	9.09±0.09 ^{B,C}	9.30±0.06	9.40±0.09	9.32±0.03	9.38±0.08
Bif164	8.33±0.49	8.15±0.97	8.35±0.25	7.87±0.14	8.46±0.71	8.55±0.54	7.75±0.79	7.38±0.26	7.51±0.63	8.15±0.77	7.69±0.67	7.90±1.15	8.07±0.20	7.84±0.44	8.44±0.12	7.52±0.78
Chis150	9.69±0.01 ^{C,D}	9.35±0.17	9.26±0.20 ^a	9.15±0.26	9.45±0.14	9.33±0.13	9.51±0.51	9.46±0.35	9.12±0.22 ^{C,B}	9.32±0.12	9.30±0.44 ^a	9.49±0.45	9.38±0.21	9.39±0.32	9.36±0.14	9.51±0.26
Clit135	8.79±0.22	9.20±0.02	9.16±0.07 ^D	9.29±0.20	9.08±0.04	9.17±0.15	9.24±0.04 ^D	9.14±0.20	8.87±0.37	9.11±0.19	8.98±0.05 ^{B,C}	9.08±0.09	9.03±0.02	9.05±0.18	9.02±0.18	9.00±0.26
Ecy1387	9.31±0.17	8.86±0.53	8.68±0.17 ^C	9.47±0.13	9.05±0.51	8.97±0.15	9.28±0.13 ^B	9.24±0.18	9.11±0.34	9.37±0.13 ^A	9.40±0.45	9.45±0.12 ^A	9.28±0.36	8.67±0.10 ^D	8.87±0.56	8.99±0.17 ^D
Erec482	9.83±0.07	9.73±0.16	9.54±0.22	9.76±0.15 ^D	9.66±0.11	9.80±0.17	9.50±0.13	9.80±0.13 ^D	9.83±0.28	9.71±0.14	9.91±0.36	10.17±0.08 ^{A,B,C}	10.03±0.13 ^C	9.85±0.12	9.45±0.13 ^a	9.60±0.03 ^D
Fpra655	9.36±0.34	8.51±0.40	8.65±0.31	8.58±0.22	9.17±0.44	8.80±0.20	8.88±0.08 ^A	8.84±0.17	8.78±0.11	9.15±0.27	8.60±0.39	9.16±0.30	8.90±0.11	8.97±0.10	8.04±0.54 ^C	8.86±0.07
Lab158	9.02±0.27	8.99±0.29 ^C	9.28±0.11 ^D	9.25±0.05 ^A	9.20±0.37 ^d	9.47±0.06 ^{B,D}	9.29±0.06 ^D	9.48±0.13 ^{a,A}	9.06±0.37 ^c	8.80±0.32 ^{C,d,A,C}	9.49±0.06 ^{a,b,B,C}	9.32±0.16 ^b	9.07±0.63	9.43±0.06 ^D	9.19±0.40	8.97±0.07 ^{B,C}
Prop853	9.80±0.26	9.72±0.11	9.46±0.29	9.51±0.27	9.73±0.21	9.70±0.08	9.75±0.21	9.75±0.17	9.94±0.20	9.80±0.29	9.49±0.31	9.39±0.19	10.03±0.05 ^C	9.73±0.21 ^C	9.36±0.47 ^{a,b}	9.59±0.08
Rbro730/ Rfla729§	9.59±0.31	9.51±0.42	9.30±0.22	9.89±0.01 ^D	9.51±0.09	9.43±0.05	9.71±0.16	9.80±0.10	9.68±0.17	9.60±0.23	9.33±0.43	9.71±0.04 ^B	9.73±0.11	9.55±0.17	9.51±0.23	9.72±0.10

*The values are means ± standard errors of the means (n=4)

† Legend:

(P-value<0.05)

- a Significant difference from time point 1;
- b Significant difference from time point 3;
- c Significant difference from time point 7;
- d Significant difference from time point 10;

- A Significant difference with the control
- B Significant difference with the beads
- C Significant difference with the bacteria
- D Significant difference with the bacteria encapsulated

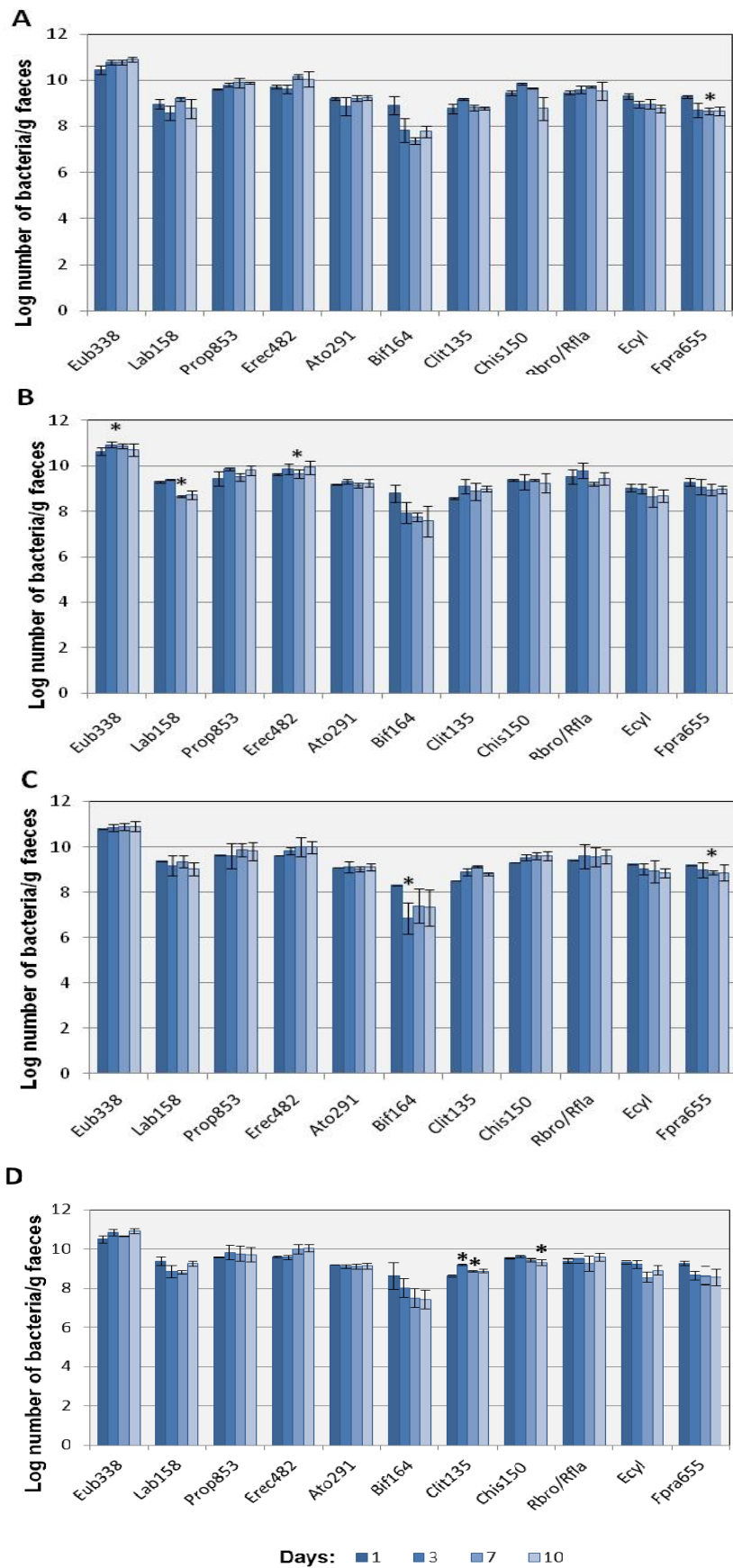


Fig. 52 Modifications of the fecal microbial population during the 10-day Xanthan:Gellan gum test. **A.** Control (T) **B.** *L. plantarum* CRL 1815 (B) **C.** Beads of Xanthan:Gellan gum (CV) **D.** *L. plantarum* CRL 1815 beads of Xanthan:Gellan gum (CB). *Significantly different from day 1 within the same probe ($p < 0.05$)

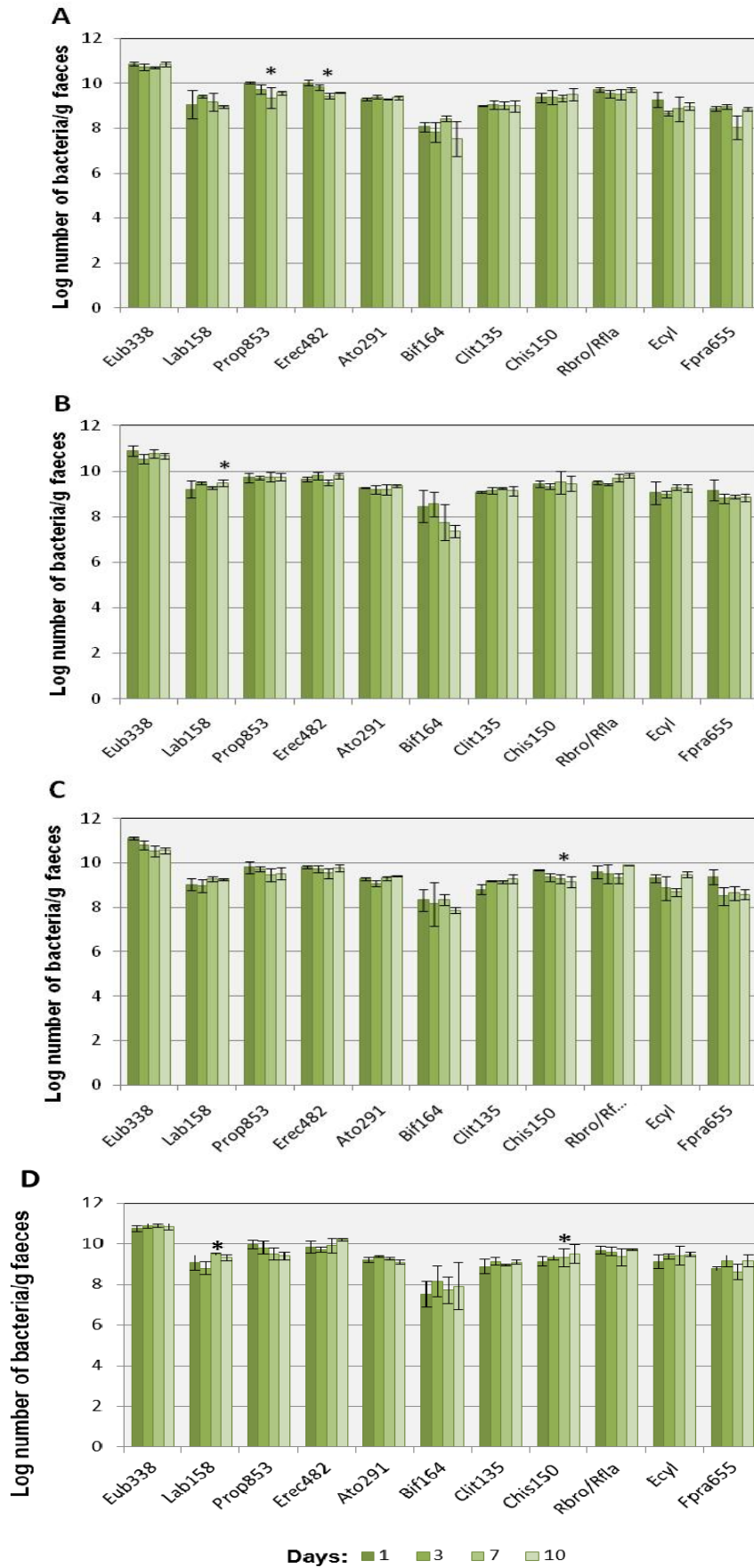


Fig. 53 Modifications of the fecal microbial population during the 10-day Jamilan:Gellan gum test. **A.** Control (T) **B.** *L. plantarum* CRL 1815 (B) **C.** Beads of Jamilan:Gellan gum (CV) **D.** *L. plantarum* CRL 1815 beads of Jamilan:Gellan gum (CB). *Significantly different from day 1 within the same probe ($p < 0.05$)

From the results from the absolute data obtained in this study we can observe that all the baselines data (day 1) showed similar levels within every probe. Three exceptions to this were detected with *Atopobium* cluster in the Xanthan:Gellan gum test and total bacteria and *C. histolyticum* group in the Jamilan:Gellan gum test. However these values were normalized and no significant differences were found as the study progressed.

Most of the bacterial groups remained at similar levels during the 10 days of the study when compared with the baseline data. Only the *Bifidobacterium* group showed a marked tendency to decrease as the study progress, although only when the beads of Xanthan:Gellan gum (0.75%:1%) were administered a significant decrease were detected at day 3 ($p < 0.05$). Significant differences from baseline were also found for other bacterial groups ($p < 0.05$). The control groups registered significant decreases at day 7, in the *F. prausnitzii* cluster during the Xanthan:Gellan gum test and in the *C. coccooides-E. rectale* group and the Clostridial cluster IX during the Jamilan:Gellan gum test. A significant decrease in the *F. prausnitzii* cluster during the Xanthan:Gellan gum test were also found at day 7 when beads of Xanthan:Gellan gum (0.75%:1%) were administered, decrease that it should be taken carefully as the control group also presented this same profile.

The administration of *L. plantarum* CRL 1815 produced different responses in the *Lactobacillus-Enterococcus* group in the two animal groups, when both immobilized and non-immobilized forms were administered. In the Xanthan:Gellan gum test, a significant decrease was detected at day 7, although no modifications were found when the strain was administered in the encapsulated form. On the contrary, a significant increase was detected as a consequence of this strain administration in the Jamilan:Gellan gum test at day 10 and 7 of administration of free and immobilized microorganisms, respectively.

Beyond this bacterial group, *L. plantarum* free administration also caused a significant increase on the *C. coccooides-E. rectale* group at day 7, when compared to the baseline and control results, and on numbers of total bacteria at day 3 during the Xanthan:Gellan gum test.

The administration of *L. plantarum* immobilized with both wall materials exerted certain type of effect on the clostridial population. This effect could be

observed not only as an increase in the *C. lituseburensis* group (significant at days 3 and 7), but also in a decrease in the *C. histolyticum* group, significant at the end of the Xanthan:Gellan gum test (day 10). Also, it was observed an increase of this *C. histolyticum* group, significant at day 7, when the wall material was Jamilan:Gellan gum (1%:1%) ($p < 0.05$). Non-probiotic beads prepared with this material (Jamilan:Gellan gum), also modulate the *C. histolyticum* group, lowering it to a significant level at day 7. However, none of these modulations were significantly different from the control group, although *C. lituseburensis* group was significantly higher when probiotic encapsulated with Xanthan:Gellan gum was administered than the values achieved at the third day by non-probiotic beads.

The proportion of Eub338 data are shown in Figures 54 and 55. Since these data represented a relative percentage to the total bacterial counts (recovered with the Eub338 probes), a group named "Others" were organized with the bacterial groups that were not detected with the probes used in this study ($100\% - \sum \% \text{all probes employed}$).

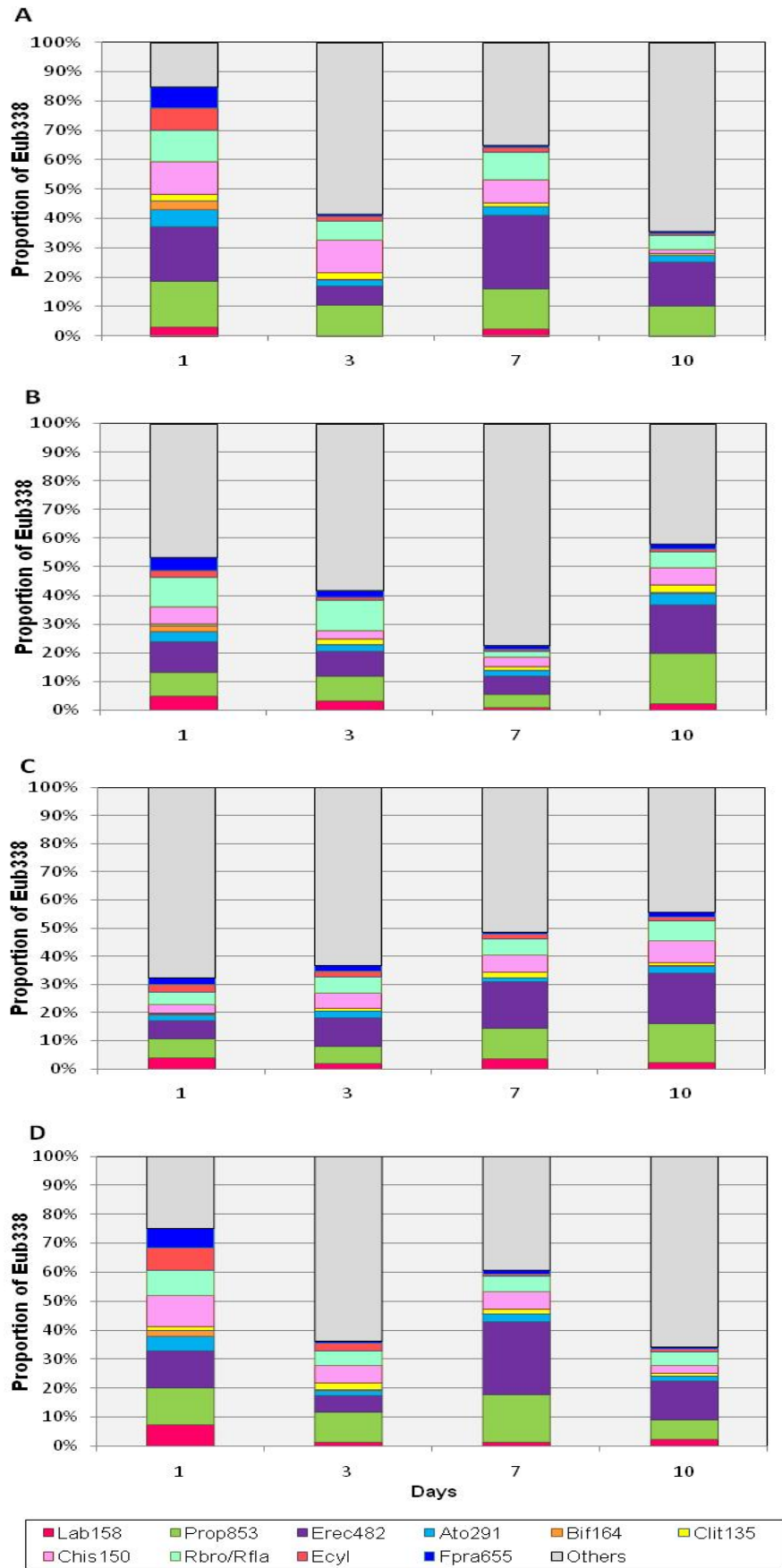


Fig. 54 Modification of the fecal microbiota population relative to the total bacteria population during the Xanthan:Gellan gum test. A. Control (T) B. *L. plantarum* CRL 1815 (B) C. Beads of Xanthan:Gellan gum (CV) D. *L. plantarum* CRL 1815 beads of Xanthan:Gellan gum (CB)

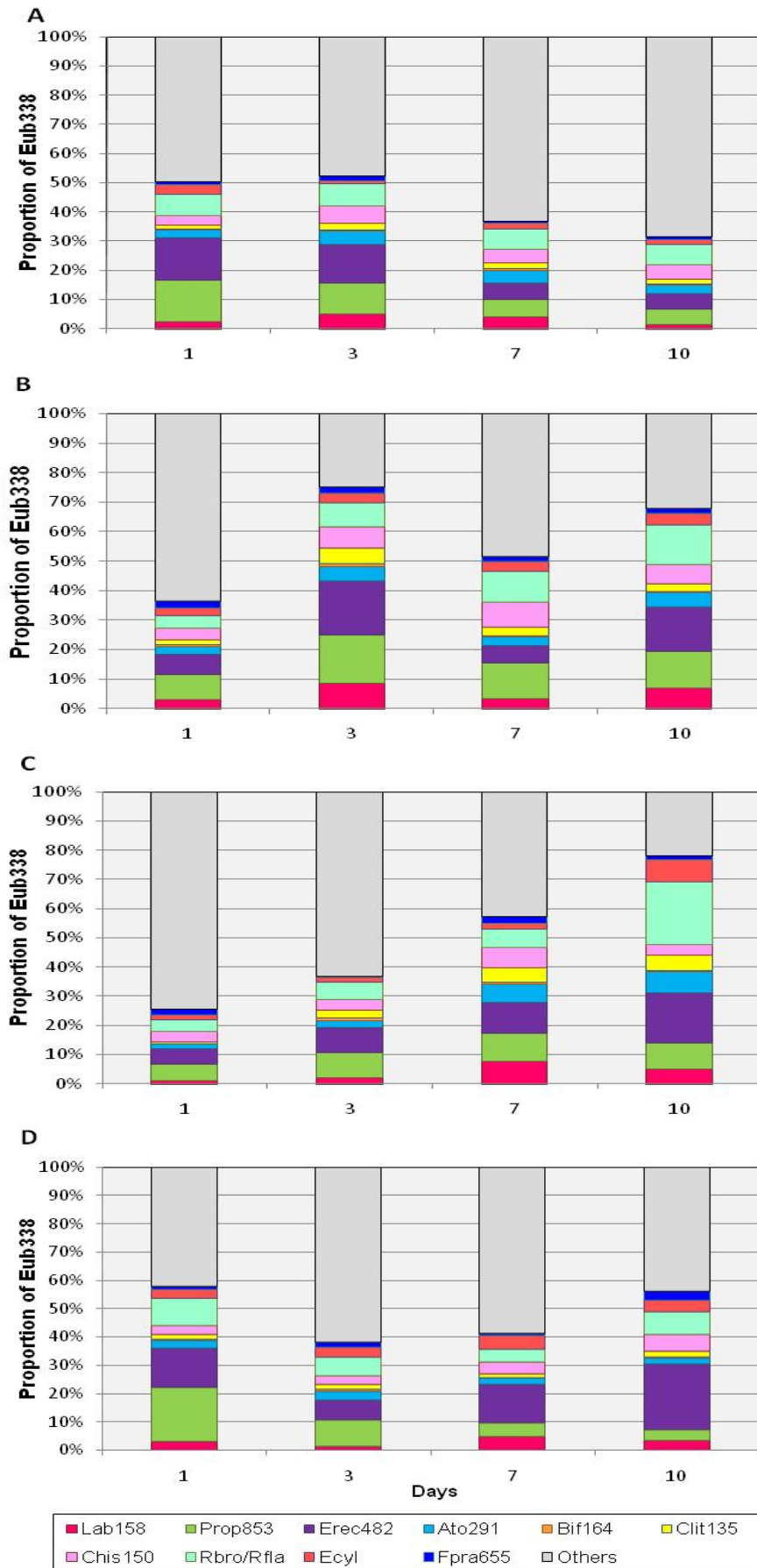


Fig. 55 Modification of the fecal microbiota population relative to the total bacteria population during the Jamilan:Gellan gum test. **A.** Control (T) **B.** *L. plantarum* CRL 1815 **(B)** *L. plantarum* CRL 1815 beads of Jamilan:Gellan gum **(CV)** **D.** *L. plantarum* CRL 1815 beads of Jamilan:Gellan gum **(CB)**

Opposed to the numbers of bacteria/g of faeces and referred to these relative data, the baseline numbers (day 1) differed considerably between groups. In the same line, the control groups showed fluctuations during the studies, fluctuations that even involved a 40% of the total bacteria detected with the probes, as it was seen between days 1 and 3 during the Xanthan:Gellan gum test. Within the control group, the Xanthan:Gellan gum test presented higher fluctuations, with increases (day 7) and decreases (day 3 and 10) that were very noticeable on the *C. coccooides-E. rectale* group. On the contrary, the experimental group of animals assayed with the Jamilan:Gellan gum test showed a tendency to decrease during the time of administration, probably associated to a decrease on the *C. coccooides-E. rectale* group and the Clostridial cluster IX. The *Lactobacillus-Enterococcus* group diminished also with the time, a data to be subjected to a deeper analysis in these experiments. The modulations of the microbiota detected might be related to the diet, the environment and the inter- and intra-individual fluctuations. As the environment and diet were exactly the same for all the experimental animal groups, the results obtained could be only associated to the inter- and intra-individual fluctuations. These type of inter- and intra-individual fluctuations has been already detected in previous studies that involved human subjects (Lepage, *et al.*, 2005; Saulnier, *et al.*, 2008) and animal (Montesi, *et al.*, 2005) faecal samples. To determine the evolution of the profiles with the different products administrations, the high level of variations between animals was taken into account as always, but, as these values were relative values, the population changes were more detectable and, also, very clear variations may lead to non-statistically significant differences when compared to baselines.

The administration of non-probiotic beads independently of the wall material employed showed a gradual increase of the whole bacterial population analysed as the time progress, achieving its maximum on the tenth day. Increase on the *C. coccooides-E. rectale* (from 5.30%-day 1 to 17.21%-day 10 with Jamilan:Gellan gum beads and from 6.42%-day 1 to 18.20%-day 10 with Xanthan:Gellan gum beads) and *Ruminococcus* groups (from 3.76%-day 1 to 21.27%-day 10 with Jamilan:Gellan gum beads and from 4.18%-day 1 to 7.39%-day 10 with Xanthan:Gellan gum beads) were evident in both cases. Also increases on Clostridial cluster IX (from 6.91%-day 1 to 13.86%-day 10)

and *C. histolyticum* group (more than twice the basal levels at the end) when Xanthan:Gellan gum was employed, as well as increases on *Atopobium* cluster, *E. cylindroides* (both groups from 1.5 %-day 1 to 7.5 %-day 10) and *Lactobacillus-Enterococcus* groups (from 0.89%-day 1 to 4.99%-day 10) with Jamilan:Gellan gum beads where responsible of the gradual increase with the administration time.

As observed with the numbers of bacteria/g of faeces, the administration of *L. plantarum* CRL 1815 to the animals showed a different behaviour depending on the animal experimental group, with basal bacterial percentages that differed between experimental groups, mainly on the *Ruminococcus* group. However, a pattern was observed in both cases, with a reduction of several bacterial groups at the seventh day followed by a marked increase at the tenth day, achieving finally a similar percentage of microorganisms. With the probes employed it was possible to detect the 60% and the 70% of the bacterial population at the tenth day when the test of Xanthan:Gellan gum (first experimental test) and Jamilan:Gellan gum (second experimental test) were respectively performed. In fact, in both cases a ten-fold increase was registered on the *C. coccoides-E. rectale* group and a duplication of the *Ruminococcus* group percentage at the tenth day when compared with the preceding sampling day. However, it seemed that a long term administration is needed to normalize the microbiota. Referred to the *Lactobacillus-Enterococcus* group, it was expected a clear modulation of this group, as the probiotic strain could be detected with this probe. However, only with the second experimental group of animals an increase was detected at the third day and it was not completely maintained along the study as fluctuations to basal levels were recorded at the seventh day.

The administration of the immobilized probiotic strain showed different profiles depending on the wall material. Whereas an almost identical profile compared to the control group was registered as a consequence of Xanthan:Gellan gum beads administration, Jamilan:Gellan gum beads administration modulated interestingly the microbiota, mainly the *Lactobacillus-Enterococcus* group during the time of administration. Except for a reduction at day 3, the *Lactobacillus-Enterococcus* group duplicated its numbers at the seventh day (4.44%), which was only reduced 1% at the end of the study, but still

over the initial values (2.75%) with the probiotic Jamilan:Gellan gum beads. Also, with this type of beads, a reduction of the Clostridial cluster IX to minimum levels (18.97% at day 1 to 3.77% at day 10) was observed, reduction that went with an increase on the *C. coccooides*-*E. rectale* group (14.09% at day 1 to 23.34% at day 10).

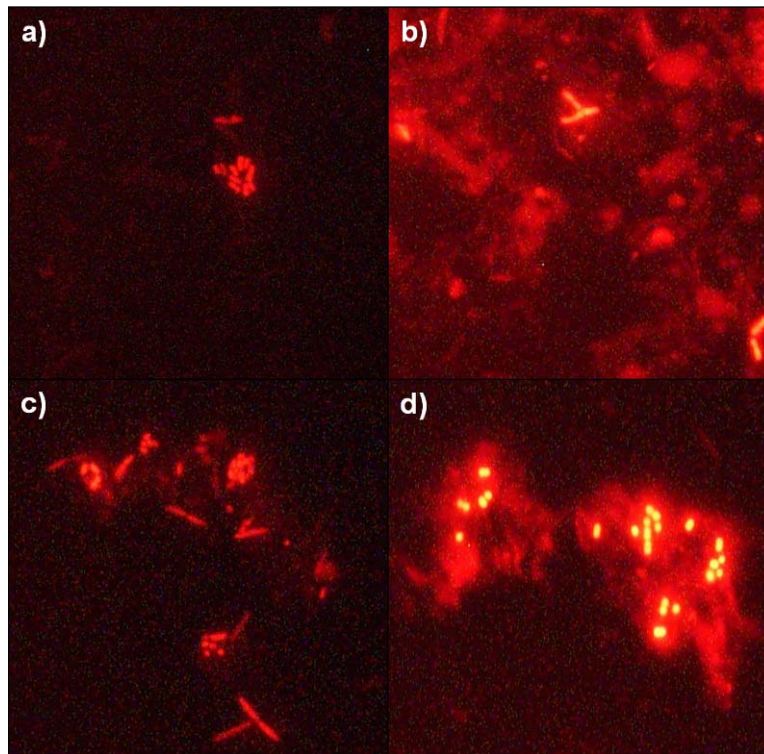


Fig. 56 Images at fluorescent microscope of rat faecal samples with different probes. a) Lab158 b) Bif164 c) Prop853 d) Ecy1387

As was already demonstrated for Eub338, Erec 482, Lab158 and Bac303 (Salzman, *et al.*, 2002), the probes used to study the human faecal microbiota and selected for this study successfully worked for murine faecal microbiota. Murine intestinal microbiota includes facultative anaerobes, such as *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *Enterobacillus* spp., and obligate anaerobes, such as *Bacteroides* spp. and *Clostridium* spp. (Salzman, *et al.*, 2002). Most of these species were targeted with the probes employed in this study (Figure 56), and certainly both facultative and strict anaerobe groups were covered.

Administration of the probiotic strain, *L. plantarum* CRL 1815, caused an impact on the *Lactobacillus*-*Enterococcus* group, however the results were not the same on both experimental groups of animals, with an increment on the

amount in one of them (Jamilan:Gellan gum) and a decrease on the other (Xanthan:Gellan gum). The dose administered was high enough to reach the recommendations (10^9 UFC/mL) of most of the scientists (Tuohy, *et al.*, 2007), but it would be interesting to study longer dosage times in order to check if the concentrations may remain stable along the time. However, independently of the experimental group of animals under study the *C. coccooides*-*E. rectale* and *Ruminococcus* groups were modified. These two groups were also modified by the non-probiotic beads, independently of their composition, although both of them had the gellan gum as their main component. In every case this modulation was related with an increase of their numbers. This fact may suggest that these groups, as they were dominant groups on the faecal microbiota, may be highly competitive and also if the administration of an exogenous element (bacteria or polysaccharides) affects other bacterial groups, they could compete for the nutrients and may displace them (Fooks & Gibson, 2002; Saulnier, *et al.*, 2009).

Non-probiotic beads clearly modulated the microbiota as, no matter which type, increased the total percentage of the microbiota related to total bacteria gradually along the time. It is well known that fructooligosaccharides (FOS) are used as prebiotics, sugars that selectively stimulate the growth and/or activity of bacteria that can improve the host health (Saulnier, *et al.*, 2008). The polymers employed for the encapsulation were polysaccharides (EPS) and even they did not act as prebiotics, they did gradually stimulate the growth of bacteria suggesting that they could be used as a substrate for intestinal bacteria fermentation or "colonic food". As it was cited before, the main polysaccharide was gellan gum, therefore with both beads, *C. coccooides*-*E. rectale* and *Ruminococcus* groups were affected. However, the beads prepared with xanthan gum were more clostridial specific, whereas the jamilan ones presented a wider spectrum, stimulating the growth of *Actinobacteria* (*Atopobium*) but also *Firmicutes* such as *Lactobacillus-Enterococcus* and *E. cylindroides* group. Between the clostridial groups stimulated by Xanthan:Gellan gum beads *C. histolyticum* group was included, a group that is described as potentially pathogenic and it is desirable to maintain it into low levels.

Probiotic Xanthan:Gellan gum beads administration did not modulate the microbiota, neither the *Lactobacillus-Enterococcus* group nor the rest of the

microbiota analysed. Some fluctuations along the study were detected and they were in the same order as the control ones, therefore it could not be concluded that the modulations were due to these probiotic beads administration. Otherwise, probiotic Jamilan:Gellan gum beads did exerted an effect on *Lactobacillus-Enterococcus* group, with an increase from day 7, as well as maintained the beads without probiotics property of stimulate the *C. coccoides-E. rectale* group growth. In the meanwhile, these groups increase their values, a clear displacement of some clostridial population were detected with a marked reduction of the Clostridial cluster IX.

In conclusion, the use of both wall materials showed faecal bacteria growth stimulation by themselves, however in terms of protection and availability of probiotic bacteria, only Jamilan:Gellan gum beads showed positive results even more homogeneous than probiotic bacteria without encapsulation, as well as presented modulating effects on the main bacterial groups (*C. coccoides-E. rectale* and Clostridial cluster IX).

4.3.2 Estudios de colonización y tránsito intestinal de *L.plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular.

El punto de partida de este estudio fue la administración oral diaria, a ratas Wistar, durante 10 días de perlas de Xantano:Gelano (0,75%:1%) y Jamilano:Gelano (1%:1%), con y sin probiótico inmovilizado, así como también de la cepa probiótica *L. plantarum* CRL 1815 sin inmovilizar. A continuación se muestra un resumen de las características del estudio así como también de las muestras analizadas:

	Estudios en función del tipo de perla	
	Xantano:Gelano	Jamilano:Gelano
Duración del ensayo	10 días	10 días
Cepa probiótica	<i>L. plantarum</i> CRL 1815	<i>L. plantarum</i> CRL 1815
Polímeros empleados	1%Xantano+0.75%Gelano	1%Gelano+1%Jamilano
Muestras analizadas	Heces: días 1,3,7,10 Biopsia GI*: día 11	Heces: días 1,3,7,10 Biopsias GI*: día 11

*Las biopsias corresponden al Intestino delgado proximal (duodeno), distal (íleon) y Colon.

El estudio molecular de posible colonización y tránsito intestinal de la cepa probiótica se realizó empleando técnicas basadas en la variabilidad del 16S RNA ribosómico, como es la electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura o TTGE. La realización de esta técnica de análisis de comunidades requiere, por tanto, un paso previo de extracción de ADN de las muestras recogidas asociada a una amplificación con PCR para la obtención, mediante los cebadores adecuados, de los productos a analizar.

La gran cantidad de muestras fecales y de órganos disponibles hizo necesaria una nomenclatura estricta de cada una de ellas que se mantuvo a lo largo de todo el estudio. Es por ello que a continuación se muestra la relación total la nomenclatura asociada a las muestras:

Tabla 60. Nomenclatura de las muestras fecales del estudio Xantano:Gelano

Estudio		Xantano:Gelano			
Grupos	Animal	Días			
		1	3	7	10
Cápsulas Vacías (C. V.)	1	X:G-CV-D1-1	X:G-CV-D3-1	X:G-CV-D7-1	X:G-CV-D10-1
	2	X:G-CV-D1-2	X:G-CV-D3-2	X:G-CV-D7-2	X:G-CV-D10-2
	3	X:G-CV-D1-3	X:G-CV-D3-3	X:G-CV-D7-3	X:G-CV-D10-3
	4	X:G-CV-D1-4	X:G-CV-D3-4	X:G-CV-D7-4	X:G-CV-D10-4
Bacteria (B)	5	X:G-B-D1-5	X:G-B-D3-5	X:G-B-D7-5	X:G-B-D10-5
	6	X:G-B-D1-6	X:G-B-D3-6	X:G-B-D7-6	X:G-B-D10-6
	7	X:G-B-D1-7	X:G-B-D3-7	X:G-B-D7-7	X:G-B-D10-7
	8	X:G-B-D1-8	X:G-B-D3-8	X:G-B-D7-8	X:G-B-D10-8
Bacteria encapsulada (C.B.)	9	X:G-CB-D1-9	X:G-CB-D3-9	X:G-CB-D7-9	X:G-CB-D10-9
	10	X:G-CB-D1-10	X:G-CB-D3-10	X:G-CB-D7-10	X:G-CB-D10-10
	11	X:G-CB-D1-11	X:G-CB-D3-11	X:G-CB-D7-11	X:G-CB-D10-11
	12	X:G-CB-D1-12	X:G-CB-D3-12	X:G-CB-D7-12	X:G-CB-D10-12
Testigo (T)	13	X:G-T-D1-13	X:G-T-D3-13	X:G-T-D7-13	X:G-T-D10-13
	14	X:G-T-D1-14	X:G-T-D3-14	X:G-T-D7-14	X:G-T-D10-14
	15	X:G-T-D1-15	X:G-T-D3-15	X:G-T-D7-15	X:G-T-D10-15
	16	X:G-T-D1-16	X:G-T-D3-16	X:G-T-D7-16	X:G-T-D10-16

Tabla 61. Nomenclatura de las muestras fecales del estudio Jamilano:Gelano

Estudio		Jamilano:Gelano			
Grupos	Animal	Días			
		1	3	7	10
Cápsulas Vacías (C. V.)	1	J:G-CB-D1-1	J:G-CV-D3-1	J:G-CV-D7-1	J:G-CV-D10-1
	2	J:G-CB-D1-2	J:G-CV-D3-2	J:G-CV-D7-2	J:G-CV-D10-2
	3	J:G-CB-D1-3	J:G-CV-D3-3	J:G-CV-D7-3	J:G-CV-D10-3
	4	J:G-CB-D1-4	J:G-CV-D3-4	J:G-CV-D7-4	J:G-CV-D10-4
Bacteria (B)	5	J:G-B-D1-5	J:G-B-D3-5	J:G-B-D7-5	J:G-B-D10-5
	6	J:G-B-D1-6	J:G-B-D3-6	J:G-B-D7-6	J:G-B-D10-6
	7	J:G-B-D1-7	J:G-B-D3-7	J:G-B-D7-7	J:G-B-D10-7
	8	J:G-B-D1-8	J:G-B-D3-8	J:G-B-D7-8	J:G-B-D10-8
Bacteria encapsulada (C.B.)	9	J:G-CB-D1-9	J:G-CB-D3-9	J:G-CB-D7-9	J:G-CB-D10-9
	10	J:G-CB-D1-10	J:G-CB-D3-10	J:G-CB-D7-10	J:G-CB-D10-10
	11	J:G-CB-D1-11	J:G-CB-D3-11	J:G-CB-D7-11	J:G-CB-D10-11
	12	J:G-CB-D1-12	J:G-CB-D3-12	J:G-CB-D7-12	J:G-CB-D10-12
Testigo (T)	13	J:G-T-D1-13	J:G-T-D3-13	J:G-T-D7-13	J:G-T-D10-13
	14	J:G-T-D1-14	J:G-T-D3-14	J:G-T-D7-14	J:G-T-D10-14
	15	J:G-T-D1-15	J:G-T-D3-15	J:G-T-D7-15	J:G-T-D10-15
	16	J:G-T-D1-16	J:G-T-D3-16	J:G-T-D7-16	J:G-T-D10-16

Tabla 62. Nomenclatura de las muestras de órganos del estudio Xantano:Gelano

Estudio		Xantano:Gelano		
Grupos	Animal	Órganos		
		Duodeno	Íleon	Colon
Cápsulas Vacías (C. V.)	1	X:G-D-CV-1	X:G-I-CV-1	X:G-C-CV-1
	2	X:G-D-CV-2	X:G-I-CV-2	X:G-C-CV-2
	3	X:G-D-CV-3	X:G-I-CV-3	X:G-C-CV-3
	4	X:G-D-CV-4	X:G-I-CV-4	X:G-C-CV-4
Bacteria (B)	5	X:G-D-B-5	X:G-I-B-5	X:G-C-B-5
	6	X:G-D-B-6	X:G-I-B-6	X:G-C-B-6
	7	X:G-D-B-7	X:G-I-B-7	X:G-C-B-7
	8	X:G-D-B-8	X:G-I-B-8	X:G-C-B-8
Bacteria encapsulada (C.B.)	9	X:G-D-CB-9	X:G-I-CB-9	X:G-C-CB-9
	10	X:G-D-CB-10	X:G-I-CB-10	X:G-C-CB-10
	11	X:G-D-CB-11	X:G-I-CB-11	X:G-C-CB-11
	12	X:G-D-CB-12	X:G-I-CB-12	X:G-C-CB-12
Testigo (T)	13	X:G-D-T-13	X:G-I-T-13	X:G-C-T-13
	14	X:G-D-T-14	X:G-I-T-14	X:G-C-T-14
	15	X:G-D-T-15	X:G-I-T-15	X:G-C-T-15
	16	X:G-D-T-16	X:G-I-T-16	X:G-C-T-16

Tabla 63. Nomenclatura de las muestras de órganos del estudio Jamilano:Gelano

Estudio		Jamilano:Gelano		
Grupos	Animal	Órganos		
		Duodeno	Íleon	Colon
Cápsulas Vacías (C. V.)	1	J:G-D-CV-1	J:G-I-CV-1	J:G-C-CV-1
	2	J:G-D-CV-2	J:G-I-CV-2	J:G-C-CV-2
	3	J:G-D-CV-3	J:G-I-CV-3	J:G-C-CV-3
	4	J:G-D-CV-4	J:G-I-CV-4	J:G-C-CV-4
Bacteria (B)	5	J:G-D-B-5	J:G-I-B-5	J:G-C-B-5
	6	J:G-D-B-6	J:G-I-B-6	J:G-C-B-6
	7	J:G-D-B-7	J:G-I-B-7	J:G-C-B-7
	8	J:G-D-B-8	J:G-I-B-8	J:G-C-B-8
Bacteria encapsulada (C.B.)	9	J:G-D-CB-9	J:G-I-CB-9	J:G-C-CB-9
	10	J:G-D-CB-10	J:G-I-CB-10	J:G-C-CB-10
	11	J:G-D-CB-11	J:G-I-CB-11	J:G-C-CB-11
	12	J:G-D-CB-12	J:G-I-CB-12	J:G-C-CB-12
Testigo (T)	13	J:G-D-T-13	J:G-I-T-13	J:G-C-T-13
	14	J:G-D-T-14	J:G-I-T-14	J:G-C-T-14
	15	J:G-D-T-15	J:G-I-T-15	J:G-C-T-15
	16	J:G-D-T-16	J:G-I-T-16	J:G-C-T-16

4.3.2.1 Extracción de ADN y calidad de productos obtenidos.

La extracción de ADN genómico de la cepa probiótica pura (*L. plantarum* CRL 1815) no presentó problemas, obteniéndose abundante ADN de gran calidad. Los métodos de extracción de ADN utilizados en este trabajo para muestras de heces y órganos se basaron en la metodología descrita por Godon *et al.* (1997) y Lepage *et al.* (2005), respectivamente. Ambas metodologías fueron descritas para muestras de procedencia humana. A pesar de este hecho, se mostró su validez como métodos de extracción de ADN a partir de muestras procedentes de ratas en este estudio, ya que se pudo obtener ADN del 100% de las muestras fecales y de órganos. Sin embargo, la calidad del ADN extraído no fue demasiado alta (Figura 57), distinguiéndose en los geles de agarosa, además de la banda correspondiente al ADN genómico, trazas de material genético a lo largo del carril de avance. Estos resultados podrían estar

relacionado con un mayor contenido en fibra y menor contenido en agua de las heces de ratas en comparación a las humanas y a una interferencia con los tejidos de los órganos, puesto que aunque la técnica empleada es específica para ADN bacteriano, no se puede garantizar la total exclusión de ADN celular eucariota durante el proceso, ADN que aparecería muy degradado por los procesos de extracción a los que se sometió la muestra.

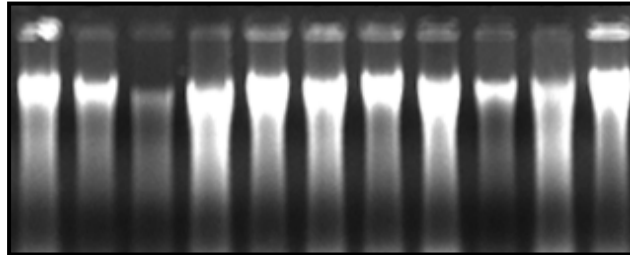


Fig. 57 Muestras de ADN de procedencia fecal en gel de agarosa 0,8%

La presencia de estas trazas de ADN hizo imposible la cuantificación exacta del ADN extraído mediante técnicas espectrofotométricas, ya que los resultados obtenidos no se correspondían con los observados en el gel. De este modo, la cuantificación del ADN se realizó en todos los casos de manera relativa en gel de agarosa y con respecto a un patrón, para lo cual se incorporó al gel el marcador DNA Molecular Weight Marker II (Roche) de 0,12-23,1 kpb.

4.3.2.2 Amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos de ADN obtenidos se llevó a cabo con 2 objetivos diferentes: por un lado la amplificación de un fragmento de 1500 pb del ADN de la cepa probiótica para obtener su secuencia completa y por otro, la amplificación de las regiones V6-V8 del ADN extraído de las muestras fecales y de órganos para obtener los productos de PCR necesarios para la realización de la TTGE.

A- Amplificación y secuenciación del gen completo del 16SrRNA.

Para conocer la secuencia completa de la cepa probiótica empleada en el estudio, se amplificó un fragmento de 1500 pb de su ADN mediante los cebadores 16F27/16R1525 y una vez obtenido este fragmento se purificó y envió a secuenciar con los cebadores 357-F/519-R/945-F. La secuencia obtenida, mostrada en el anexo, se analizó utilizando la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) obteniéndose y verificándose una similitud del 100% con *L.plantarum* (“Identities”=1532/1532; “Gaps”= 0/1532; Accesion number: AB362755.1).

B- Amplificación de las regiones V6-V8 para su análisis por TTGE.

La realización del análisis de comunidades microbianas mediante TTGE requiere una amplificación previa del ADN utilizando los cebadores adecuados de acuerdo a lo que se pretende estudiar. En el presente estudio, el ADN obtenido de las muestras fecales y de tejidos, así como también el procedente de la cepa probiótica, se empleó como molde para la amplificación de las regiones V6-V8 del 16SrRNA, empleando los cebadores universales U968-GC-F y L1401-R, para un estudio general de la microbiota.

Debido a las impurezas detectadas en el ADN procedente de materia fecal y tejidos las cuales pueden ejercer un efecto inhibitorio de la reacción, se probaron varias diluciones del ADN molde (1 y 1,5 μ L del extracto original o 1 μ L de una dilución 1/10 del mismo). Los mejores resultados se obtuvieron al emplear 1 μ L del extracto original para muestras fecales (Figura 58) y 1 μ L de una dilución 1/10 del mismo para muestras procedentes de órganos (Figura 59), mostrando que en el ADN procedente de tejidos existe una cantidad importante de inhibidores de la amplificación.

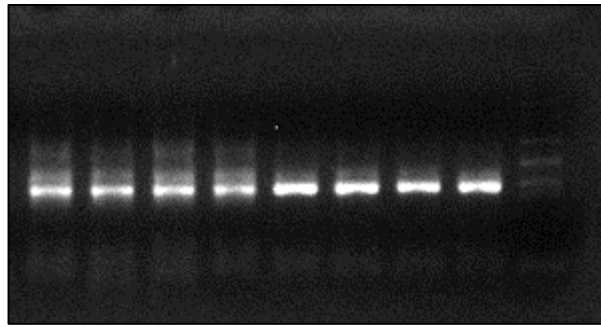


Fig. 58 Productos de PCR procedentes de ADN fecal en gel de agarosa 2%

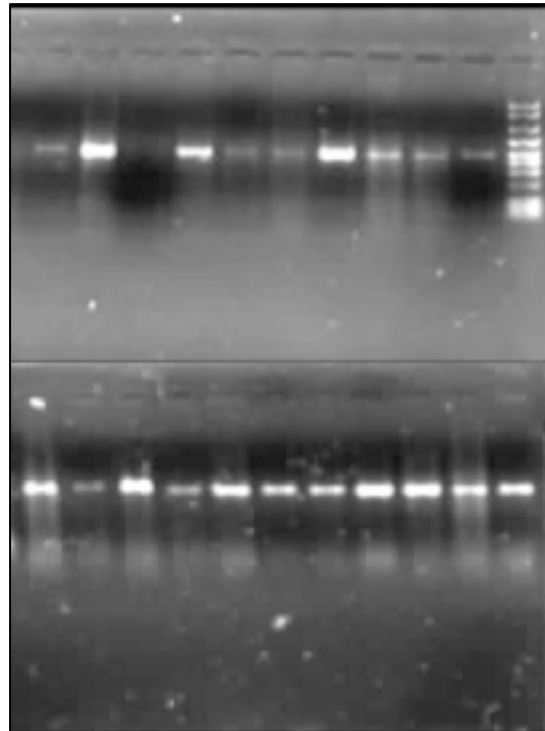


Fig. 59 Productos de PCR procedentes de ADN de órganos en gel de agarosa 2%. Arriba: Jamilano:Gelano (1%:1%). Abajo: Xantano:Gelano (1%:0,75%)

Los productos de PCR resultantes fueron del tamaño esperado (450 pb), de acuerdo con el marcador de peso molecular AmpliSize™ Molecular Ruler (Bio Rad) de 50 a 2000 pb, presentando banda única en todos los casos. La cantidad de producto de PCR obtenido fue desigual dependiendo de la muestra de procedencia. Esto, aunque puede ser debido a un menor contenido microbiano en la muestra, también puede estar asociado a una mayor presencia de inhibidores.

Aunque se obtuvieron productos de PCR en el 100% de los casos cuando el ADN procedía de muestras fecales, sin embargo cuando éste provenía de órganos se obtuvieron productos de PCR en el 83,33% de los casos. Concretamente, cuando el ADN provenía de órganos del estudio de

Xantano:Gelano, se obtuvieron productos de PCR en el 100% de los casos mientras que, cuando provenía del estudio de Jamilano:Gelano, se obtuvieron en el 77,08% de los casos, de los cuales únicamente 1 era procedente de una muestra de colon. Este hecho nos da idea, por un lado, de la especificidad de los cebadores empleados los cuales solo amplificaron ADN bacteriano, indicando que en algunos casos posiblemente el ADN extraído era de procedencia tisular en lugar de bacteriano; y por otro, que en los animales empleados en el estudio de Xantano:Gelano la microbiota asociada a las paredes intestinales puede ser que fuera superior a la de los empleados en el estudio de Jamilano:Gelano, dentro del cual las muestras procedentes de duodeno fueron las que posiblemente tuvieron menor cantidad de microbiota asociada.

Debido a la comentada ausencia de productos de PCR en algunas muestras procedentes de órganos y a que finalmente no se pudieron obtener muestras fecales de todos los animales en cada muestreo, finalmente los productos de PCR disponibles para el análisis por TTGE fueron los siguientes:

Tabla 64. Producto de PCR de muestras fecales del estudio Xantano:Gelano

Estudio		Xantano:Gelano			
Grupos	Animal	Días			
		1	3	7	10
Cápsulas	1	X:G-CV-D1-1	X:G-CV-D3-1	X:G-CV-D7-1	X:G-CV-D10-1
Vacías	2	X:G-CV-D1-2	X:G-CV-D3-2	X:G-CV-D7-2	X:G-CV-D10-2
(C. V.)	3	N.D.	X:G-CV-D3-3	X:G-CV-D7-3	X:G-CV-D10-3
	4	N.D.	X:G-CV-D3-4	N.D.	N.D.
Bacteria (B)	5	X:G-B-D1-5	N.D.	X:G-B-D7-5	X:G-B-D10-5
	6	X:G-B-D1-6	X:G-B-D3-6	X:G-B-D7-6	X:G-B-D10-6
	7	N.D.	X:G-B-D3-7	X:G-B-D7-7	X:G-B-D10-7
	8	N.D.	X:G-B-D3-8	N.D.	X:G-B-D10-8
Bacteria encapsulada (C.B.)	9	X:G-CB-D1-9	X:G-CB-D3-9	X:G-CB-D7-9	X:G-CB-D10-9
	10	X:G-CB-D1-10	X:G-CB-D3-10	X:G-CB-D7-10	X:G-CB-D10-10
	11	N.D.	X:G-CB-D3-11	X:G-CB-D7-11	X:G-CB-D10-11
	12	N.D.	X:G-CB-D3-12	N.D.	N.D.
Testigo (T)	13	X:G-T-D1-13	X:G-T-D3-13	X:G-T-D7-13	X:G-T-D10-13
	14	X:G-T-D1-14	X:G-T-D3-14	X:G-T-D7-14	X:G-T-D10-14
	15	N.D.	X:G-T-D3-15	X:G-T-D7-15	N.D.
	16	N.D.	X:G-T-D3-16	N.D.	N.D.

N.D. : No disponible

Tabla 65. Producto de PCR de muestras fecales del estudio Jamilano:Gelano

Estudio		Jamilano:Gelano			
Grupos	Animal	Días			
		1	3	7	10
Cápsulas Vacías (C. V.)	1	J:G-CV-D1-1	J:G-CV-D3-1	J:G-CV-D7-1	J:G-CV-D10-1
	2	J:G-CV-D1-2	J:G-CV-D3-2	J:G-CV-D7-2	N.D.
	3	J:G-CV-D1-3	J:G-CV-D3-3	J:G-CV-D7-3	J:G-CV-D10-3
	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Bacteria (B)	5	J:G-B-D1-5	J:G-B-D3-5	J:G-B-D7-5	J:G-B-D10-5
	6	J:G-B-D1-6	J:G-B-D3-6	J:G-B-D7-6	J:G-B-D10-6
	7	J:G-B-D1-7	J:G-B-D3-7	N.D.	J:G-B-D10-7
	8	J:G-B-D1-8	N.D.	J:G-B-D7-8	N.D.
Bacteria encapsulada (C.B.)	9	J:G-CB-D1-9	J:G-CB-D3-9	J:G-CB-D7-9	J:G-CB-D10-9
	10	J:G-CB-D1-10	J:G-CB-D3-10	J:G-CB-D7-10	J:G-CB-D10-10
	11	J:G-CB-D1-11	J:G-CB-D3-11	J:G-CB-D7-11	J:G-CB-D10-11
	12	N.D.	J:G-CB-D3-12	J:G-CB-D7-12	N.D.
Testigo (T)	13	J:G-T-D1-13	J:G-T-D3-13	J:G-T-D7-13	J:G-T-D10-13
	14	J:G-T-D1-14	J:G-T-D3-14	J:G-T-D7-14	J:G-T-D10-14
	15	J:G-T-D1-15	N.D.	J:G-T-D7-15	J:G-T-D10-15
	16	J:G-T-D1-16	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : No disponible

Tabla 66. Producto de PCR de muestras de órganos del estudio Xantano:Gelano

Estudio		Xantano:Gelano		
Grupos	Animal	Órganos		
		Duodeno	Íleon	Colon
Cápsulas Vacías (C. V.)	1	X:G-D-CV-1	X:G-I-CV-1	X:G-C-CV-1
	2	X:G-D-CV-2	X:G-I-CV-2	X:G-C-CV-2
	3	X:G-D-CV-3	X:G-I-CV-3	X:G-C-CV-3
	4	X:G-D-CV-4	X:G-I-CV-4	X:G-C-CV-4
Bacteria (B)	5	X:G-D-B-5	X:G-I-B-5	X:G-C-B-5
	6	X:G-D-B-6	X:G-I-B-6	X:G-C-B-6
	7	X:G-D-B-7	X:G-I-B-7	X:G-C-B-7
	8	X:G-D-B-8	X:G-I-B-8	X:G-C-B-8
Bacteria encapsulada (C.B.)	9	X:G-D-CB-9	X:G-I-CB-9	X:G-C-CB-9
	10	X:G-D-CB-10	X:G-I-CB-10	X:G-C-CB-10
	11	X:G-D-CB-11	X:G-I-CB-11	X:G-C-CB-11
	12	X:G-D-CB-12	X:G-I-CB-12	X:G-C-CB-12
Testigo (T)	13	X:G-D-T-13	X:G-I-T-13	X:G-C-T-13
	14	X:G-D-T-14	X:G-I-T-14	X:G-C-T-14
	15	X:G-D-T-15	X:G-I-T-15	X:G-C-T-15
	16	X:G-D-T-16	X:G-I-T-16	X:G-C-T-16

N.D. : No disponible

Tabla 67. Producto de PCR de muestras de órganos del estudio Jamilano:Gelano

Estudio		Jamilano:Gelano		
Grupos	Animal	Órganos		
		Duodeno	Íleon	Colon
Cápsulas Vacías (C. V.)	1	N.D.	J:G-I-CV-1	J:G-C-CV-1
	2	N.D.	N.D.	J:G-C-CV-2
Bacteria (B)	3	J:G-D-CV-3	J:G-I-CV-3	J:G-C-CV-3
	4	N.D.	J:G-I-CV-4	J:G-C-CV-4
	5	J:G-D-B-5	N.D.	N.D.
	6	J:G-D-B-6	J:G-I-B-6	J:G-C-B-6
Bacteria encapsulada (C.B.)	7	J:G-D-B-7	J:G-I-B-7	J:G-C-B-7
	8	N.D.	J:G-I-B-8	J:G-C-B-8
	9	J:G-D-CB-9	J:G-I-CB-9	J:G-C-CB-9
	10	J:G-D-CB-10	J:G-I-CB-10	J:G-C-CB-10
	11	N.D.	J:G-I-CB-11	J:G-C-CB-11
	12	N.D.	J:G-I-CB-12	J:G-C-CB-12
Testigo (T)	13	N.D.	J:G-I-T-13	J:G-C-T-13
	14	J:G-D-T-14	J:G-I-T-14	J:G-C-T-14
	15	N.D.	J:G-I-T-15	J:G-C-T-15
	16	J:G-D-T-16	J:G-I-T-16	J:G-C-T-16

N.D. : No disponible

4.3.2.2 Electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE)

Con el objetivo de estudiar el efecto que la administración de *L. plantarum* CRL 1815, encapsulado y sin encapsular en Xantano:Gelano (0,75%:1%) y Jamilano:Gelano (1%:1%), puede ejercer sobre la microbiota fecal y la asociada a las paredes de los órganos intestinales así como también detectar, en su caso, la presencia de la cepa administrada, se analizaron las muestras obtenidas en los estudios *in vivo* realizados mediante TTGE, obteniéndose perfiles de la composición total de la microbiota analizada. Brevemente, esta técnica permitió separar fragmentos de ADN de la misma longitud pero con secuencias diferentes, basándose en la disminución de la movilidad electroforética de las hebras de ADN parcialmente desnaturalizadas, desnaturalización que se consigue mediante un gradiente lineal de temperatura

y el empleo de geles de poliacrilamida y urea (Ogier, *et al.*, 2004). Ejemplos de los perfiles de TTGE obtenidos en cada estudio se muestran en la figura 60.

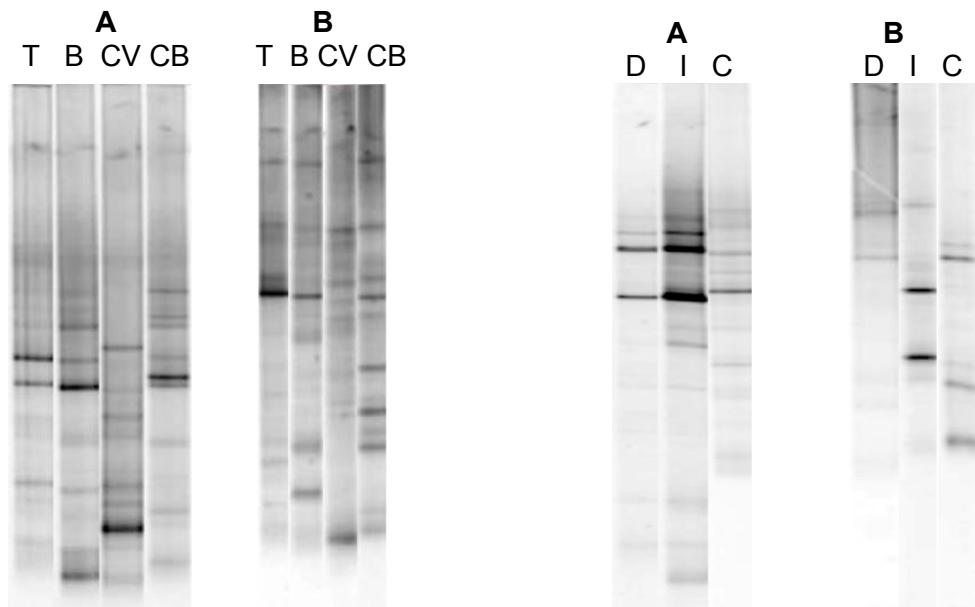


Fig. 60 A. Estudio Xantano:Gelano B. Estudio Jamilano:Gelano. T: Testigo; B: Bacteria, CV: Capsulas no probióticas, CB: Cápsulas probióticas; D: Duodeno, I: Íleon, C: Colon. Los órganos procedieron del mismo animal.

A-Análisis global de la biodiversidad microbiana de las muestras obtenidas tras la administración de *L.plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular.

De los perfiles obtenidos en el análisis en TTGE se estudió el número de bandas observadas en cada muestra así como también la intensidad media de las bandas detectadas mediante el empleo del programa Quantity One[®], resultados que se detallan en las figuras 61, 62, 63 y 64.

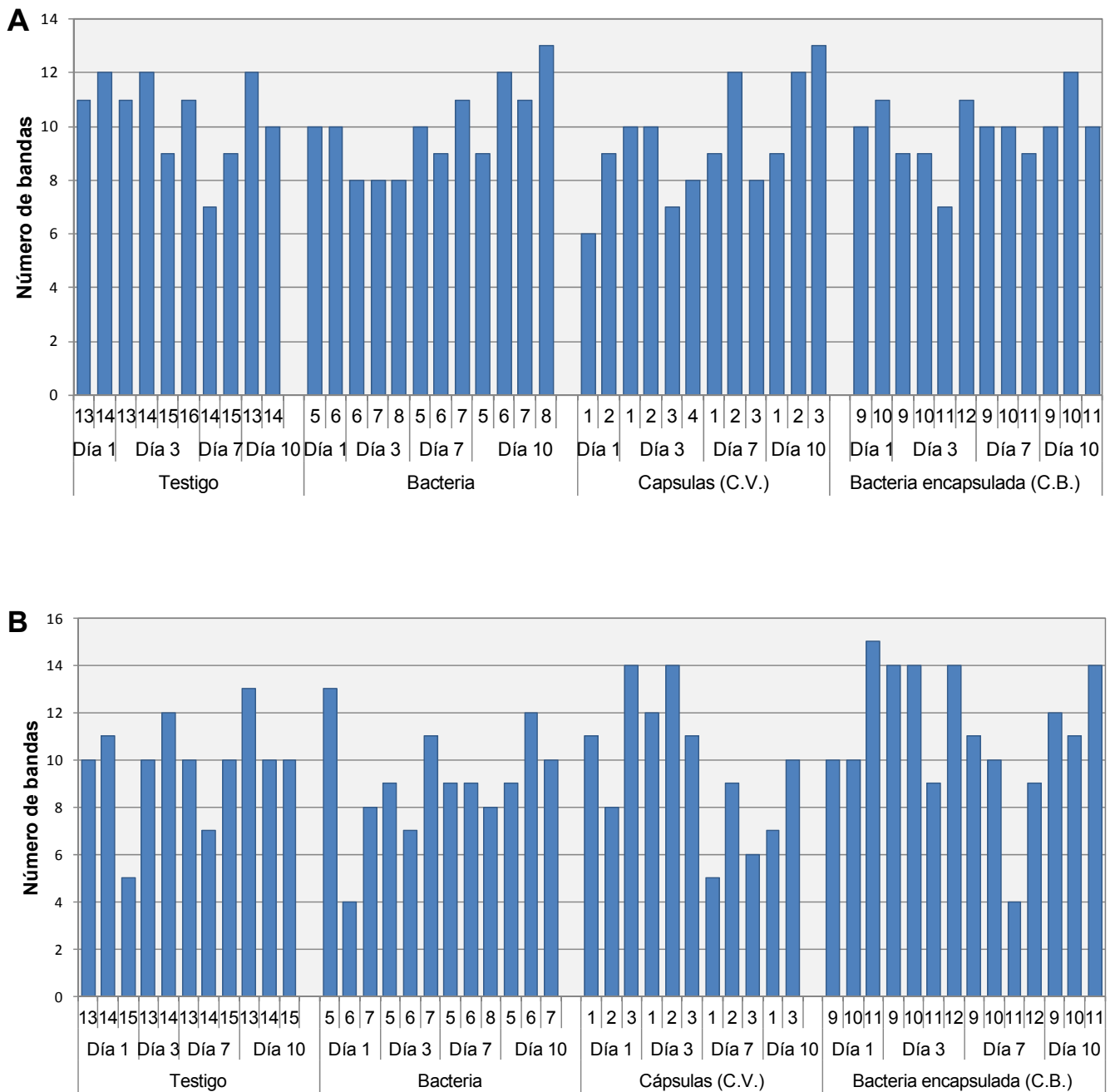


Fig. 61 Número de bandas observadas por muestra fecal. **A.** Estudio de Xantano:Gelano **B.** Estudio de Jamilano:Gelano.

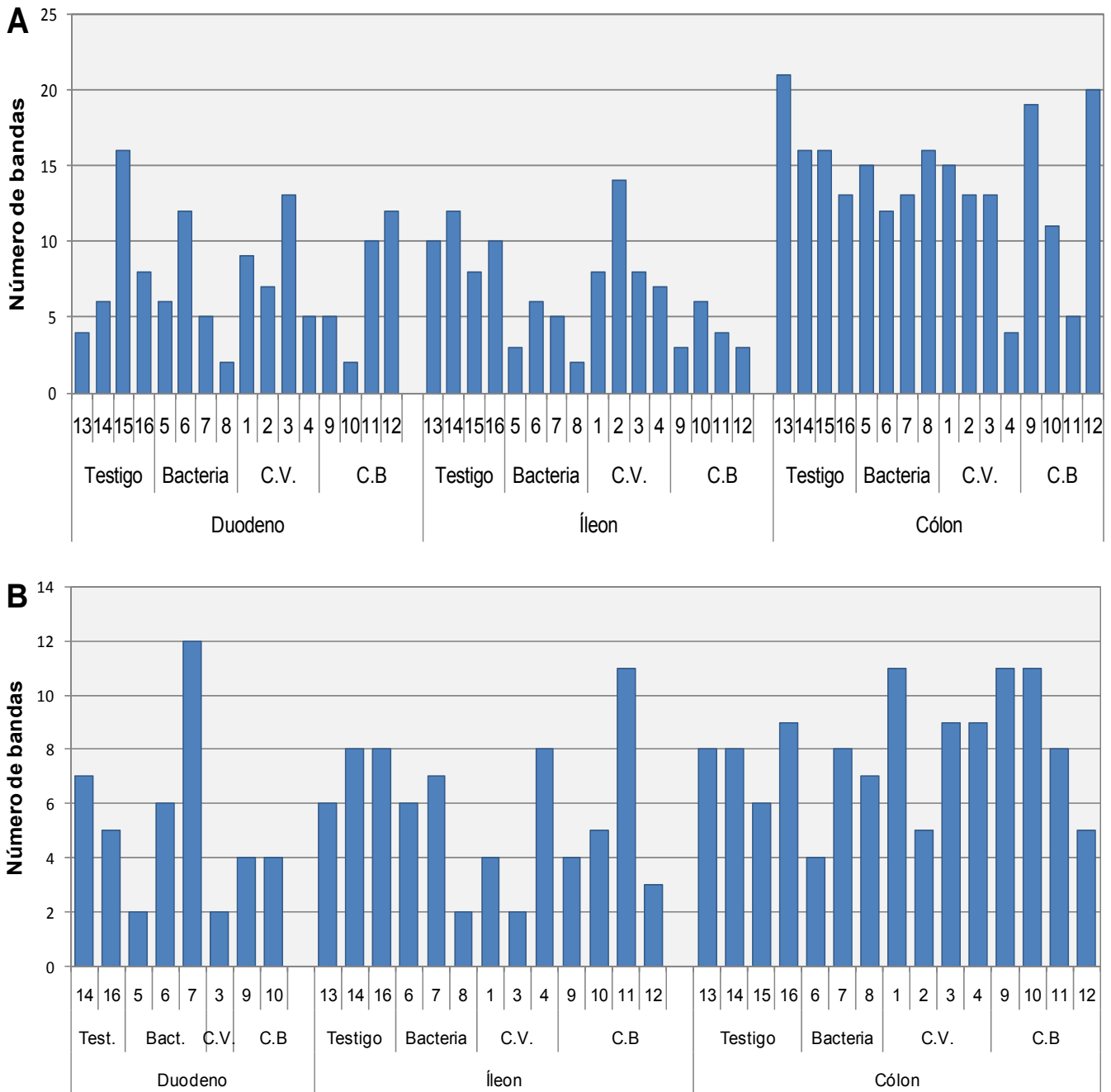


Fig.62 Número de bandas observadas por muestra de órganos. **A.** Estudio de Xantano:Gelano **B.** Estudio de Jamilano:Gelano

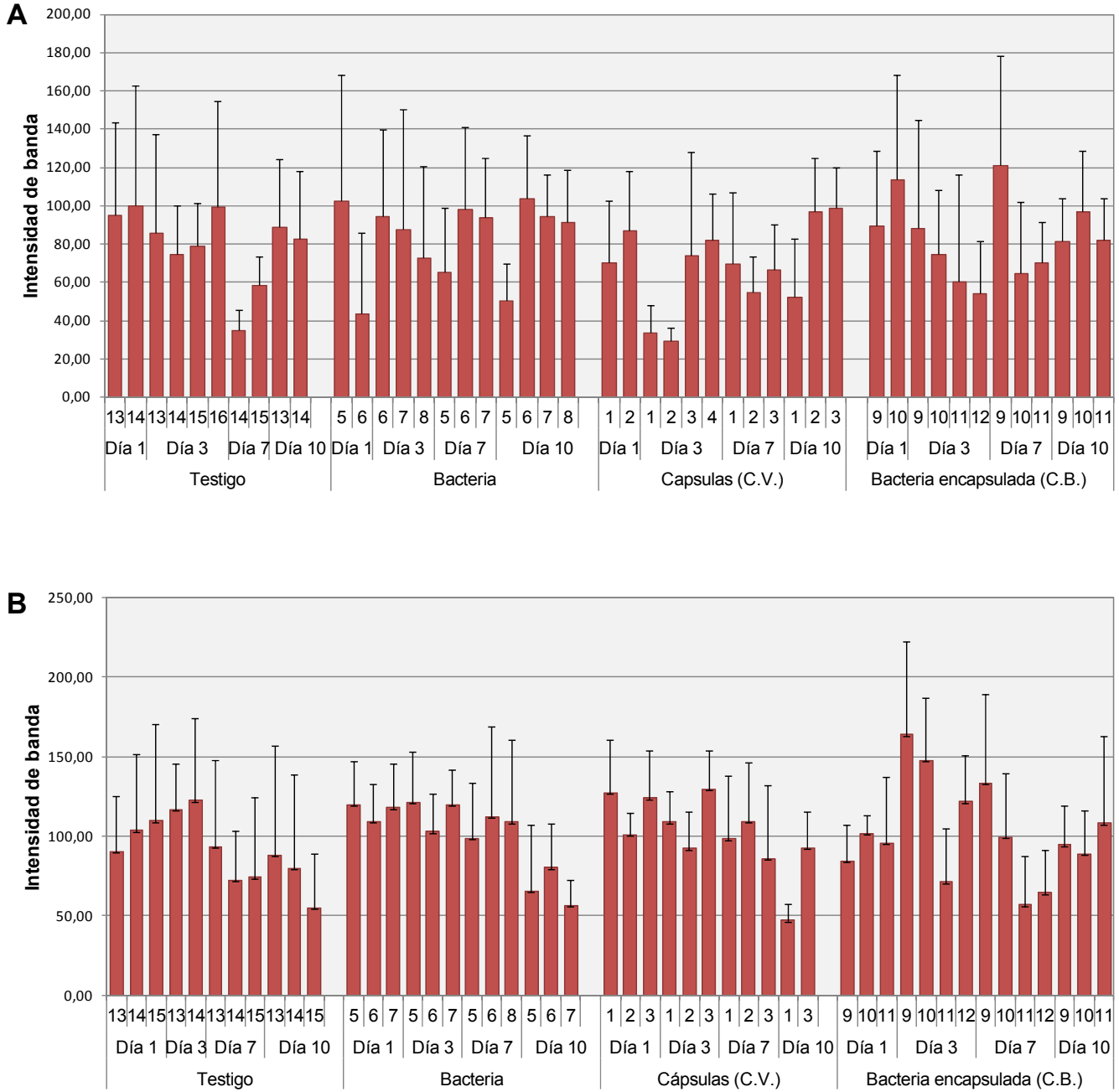


Fig.63 Intensidad media de las bandas observadas por muestra fecal. **A.** Estudio de Xantano:Gelano **B.** Estudio de Jamilano:Gelano.

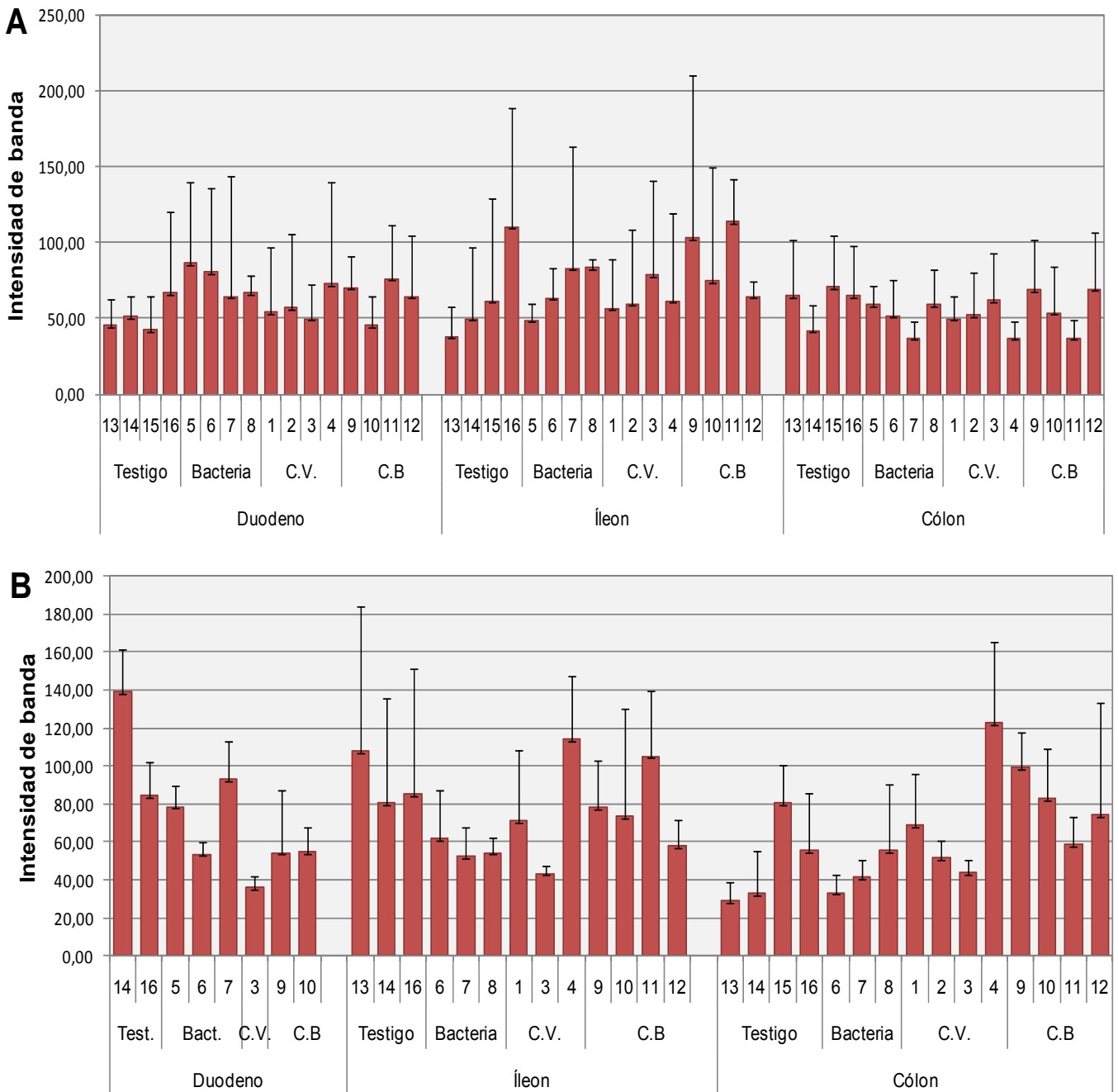


Fig.64 Intensidad media de las bandas observadas por muestra de órganos. A. Estudio de Xantano:Gelano B. Estudio de Jamilano:Gelano.

En términos generales, el número de bandas proporciona información relativa a la diversidad de la microbiota, de manera que a mayor número de especies mayoritarias presentes en la muestra, mayor número de bandas se detectarán, y por lo tanto mayor diversidad presentará esa comunidad microbiana. La intensidad de banda, en cambio, está relacionada con la cantidad de población microbiana de la muestra, es decir, a mayor intensidad de banda, mayor cantidad de ADN se encuentra formando esa banda, lo que está directamente relacionado con la cantidad de ese microorganismo concreto en la muestra. Es por tanto una medida de cuantificación relativa. Sin embargo, la intensidad de banda calculada es la media de las bandas de cada muestra, lo que aporta un valor global de la población microbiana, valor que en la mayoría de los casos presenta amplias desviaciones estándar asociadas a grandes variaciones en la intensidad entre distintas bandas.

El análisis de los perfiles de las muestras fecales reveló algunas variaciones intra-individuales a largo del tiempo pero sobre todo inter-individuales en el número de bandas de ambos estudios, variaciones que se detectaron igualmente en el grupo testigo. Estas variaciones entre individuos son inevitables a la hora de realizar estudios en seres vivos, registrándose también estas variaciones en estudios previamente realizados en perros (Jia, *et al.*, 2010), ratas (Montesi, *et al.*, 2005) y humanos (Lepage, *et al.*, 2005). Variaciones inter-individuales también se observaron al analizar los perfiles de las muestras de órganos, registrándose una mayor diversidad en la microbiota asociada al colon. Esta mayor diversidad de especies estuvo asociada a valores de intensidad de banda relativamente bajos en la microbiota asociada a colon, lo que lleva a pensar que en esta zona anatómica la mayor diversidad microbiana se alcanzó en detrimento de que cada especie pudiera incrementar su número debido a una competencia por los nutrientes (Saulnier, *et al.*, 2009).

Así, se registró una diferencia en la diversidad microbiana entre las diferentes regiones anatómicas, con una diversidad mucho mayor en el colon. Esta diferencia se hizo especialmente notable en el estudio de Xantano:Gelano, con diferencias significativas del colon con el resto de órganos en los grupos control y bacteria ($p < 0,05$). Los animales que recibieron *L. plantarum* CRL 1815 sin encapsular sólo presentaron una diversidad menor a la control en el íleon durante el estudio de Xantano:Gelano, aunque no hubo

diferencias a nivel de intensidad de banda. Sin embargo, no se puede decir que la administración de esta cepa afectara a la diversidad microbiana ni la intensidad de banda en el estudio de Jamilano:Gelano. La administración de perlas de Xantano:Gelano probióticas y no probióticas no produjo ningún efecto a nivel de intensidad de banda, pero sí efectos dispares sobre la diversidad de la microbiota, con grandes variaciones entre animales, especialmente notable en una gran diversidad en el íleon del animal 2 y en el colon de los animales 9 y 12. Por el contrario los animales 4 y 11 presentaron una microbiota estable a lo largo del tracto gastrointestinal, sin apenas variaciones entre zonas anatómicas. Por otro lado, la administración de las perlas de Jamilano:Gelano, probióticas y no probióticas, originó perfiles con un mayor número de bandas e incluso mayor intensidad de banda con las perlas probióticas, a excepción de 2 animales (2 y 12) que presentaron una menor diversidad que los testigos.

En cuanto a la microbiota fecal, al margen de las claras variaciones inter-individuales observadas en el grupo testigo, se observó una tendencia de aumento de la biodiversidad con el tiempo en los animales a los que se les administró la cepa probiótica y las perlas de Xantano:Gelano, aumento que no fue acompañado con variaciones notables en la intensidad de banda. Las perlas probióticas de Xantano:Gelano también presentaron esta tendencia, pero algo más atenuada. En el estudio de Jamilano:Gelano, se observó igualmente una tendencia de aumento de la diversidad con el tiempo en los animales a los que se les administró la cepa probiótica, esta vez asociada a una disminución significativa de la intensidad de banda en el día 10 con respecto al primer día de estudio. Las perlas de Jamilano:Gelano, en este caso tuvieron un comportamiento diferente, de manera que tanto solas como con probiótico aumentaron su diversidad el tercer día para luego registrar una reducción brusca significativa de la misma el séptimo día del estudio ($p < 0,05$). Las perlas probióticas recuperaron ampliamente su valor inicial, pero no ocurrió lo mismo con las no probióticas. La intensidad de banda en este caso tuvo una tendencia al descenso con el tiempo en el grupo de perlas no probióticas, tendencia que no se observó en las perlas probióticas.

La administración de *L.plantarum* CRL 1815 sin inmovilizar, por tanto, presentó un efecto de incremento de la diversidad de la microbiota fecal, incremento que en ocasiones fue acompañado de una reducción en la

población microbiana (intensidad de banda). Este efecto se mantuvo cuando fue inmovilizada en Xantano:Gelano, siendo estas perlas por sí mismas (sin probiótico) igualmente capaces de aumentar esta biodiversidad. Por el contrario, las perlas de Jamilano:Gelano, a pesar de un incremento inicial, provocaron una disminución de esta diversidad, la cual fue acompañada por una reducción en la intensidad de banda. Sin embargo, las perlas probióticas de Jamilano:Gelano, a pesar de presentar el mismo comportamiento inicial que las no probióticas, sí fueron capaces de aumentar la diversidad al final del estudio, probablemente debido a la acción de la cepa probiótica. El efecto sobre la microbiota asociada a los órganos no fue tan claro, pero sí se detectaron diferencias esperables en función de la región anatómica estudiada, con mayor diversidad registrada en el colon.

Además, se observó un mayor número de bandas en la microbiota asociada a los órganos durante el estudio de Xantano:Gelano que durante el estudio de Jamilano:Gelano. Esto, junto al hecho de que la microbiota fecal del estudio de Jamilano:Gelano presenta un mayor número de bandas en comparación a la del Xantano:Gelano, lleva a pensar que pudo existir una mayor colonización en los animales del estudio de Xantano:Gelano, mientras que en el estudio de Jamilano:Gelano, hubo menor colonización y por tanto un mayor tránsito de diferentes especies microbianas.

De acuerdo con estos datos podemos determinar que, aunque cuantitativamente la microbiota intestinal no se vio prácticamente afectada, según las variaciones en el número de bandas, sí existió cierto cambio cualitativo. La realización de perfiles filogenéticos mediante análisis informático de los geles obtenidos en la TTGE unido a una identificación de las bandas más representativas permitió un conocimiento más profundo de este cambio valorado a nivel cualitativo.

B-Análisis de los perfiles filogenéticos de las muestras obtenidas tras la administración de *L.plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular.

Los perfiles obtenidos mediante PCR-TTGE, tanto de muestras fecales como de órganos, para el análisis de la composición cualitativa y semicuantitativa total de la microbiota, se normalizaron y analizaron con el

software Quantity One[®] versión 4.6.3. Con ello se pretendió estudiar la posible influencia que la administración de *L. plantarum* CRL 1815, encapsulado y sin encapsular en Xantano:Gelano (0,75%:1%) y Jamilano:Gelano (1%:1%), pudo ejercer sobre esta microbiota.

Los perfiles obtenidos en el análisis de las muestras fecales se muestran en las figuras 65 y 66, mientras que los obtenidos tras el análisis de las muestras de órganos se muestran en las figuras 67 y 68.

Los perfiles obtenidos en el análisis de las muestras de heces mostraron una amplia diversidad de especies presente, independientemente del día de toma de muestra o del grupo de procedencia. En el estudio de Xantano:Gelano no se observó agrupación por grupo de administración, sin embargo sí se observó una agrupación dependiente del día de toma de muestra, así como también una agrupación de muestras que no han sido tratadas (baseline y controles). De acuerdo con el análisis del número de bandas realizado previamente en el apartado 4.3.2.2.A (Fig. 61), esto podría estar correlacionado con un aumento de la diversidad a lo largo del tiempo observado tras la administración tanto de las perlas de Xantano:Gelano como de la cepa probiótica inmovilizada y sin inmovilizar en este material.

En el estudio de Jamilano:Gelano tampoco se observó agrupación por grupo de administración y aunque hubo una cierta tendencia al agrupamiento por día de toma de muestra, ésta no fue tan clara como en el estudio anterior, mostrando un agrupamiento detectable al séptimo y décimo día de toma de muestra. Esto igualmente podría estar relacionado con las variaciones en la diversidad con el tiempo de administración observadas en el análisis del número de bandas de las muestras (apartado 4.3.2.2.A, Fig.61), especialmente a nivel de cápsula con y sin bacteria probiótica, de manera que los perfiles de las perlas se podrían ver modificados en un sentido opuesto a los perfiles de las perlas con probiótico.

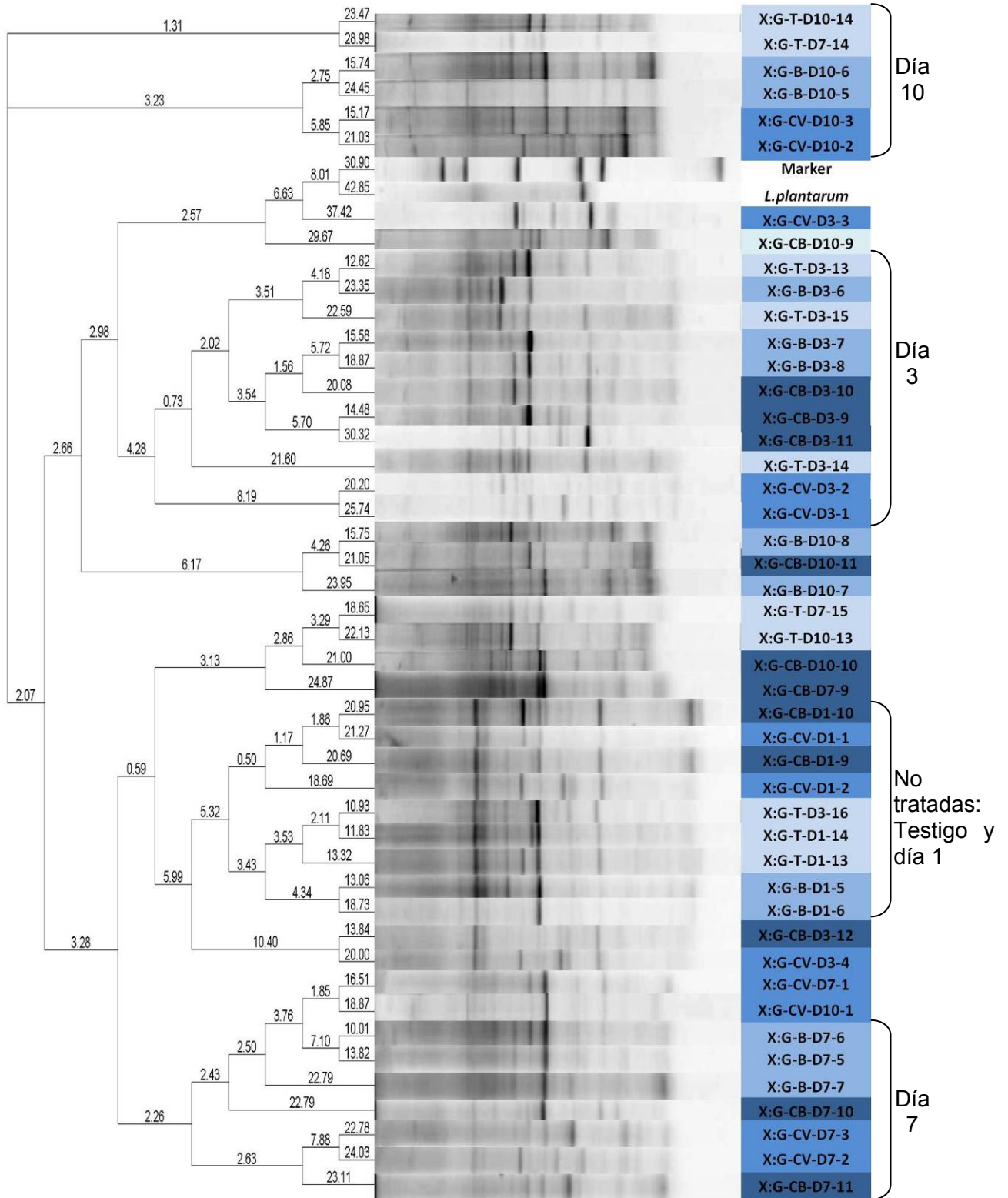


Fig. 65 Análisis en TTGE de muestras fecales del estudio de Xantano:Gelano

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

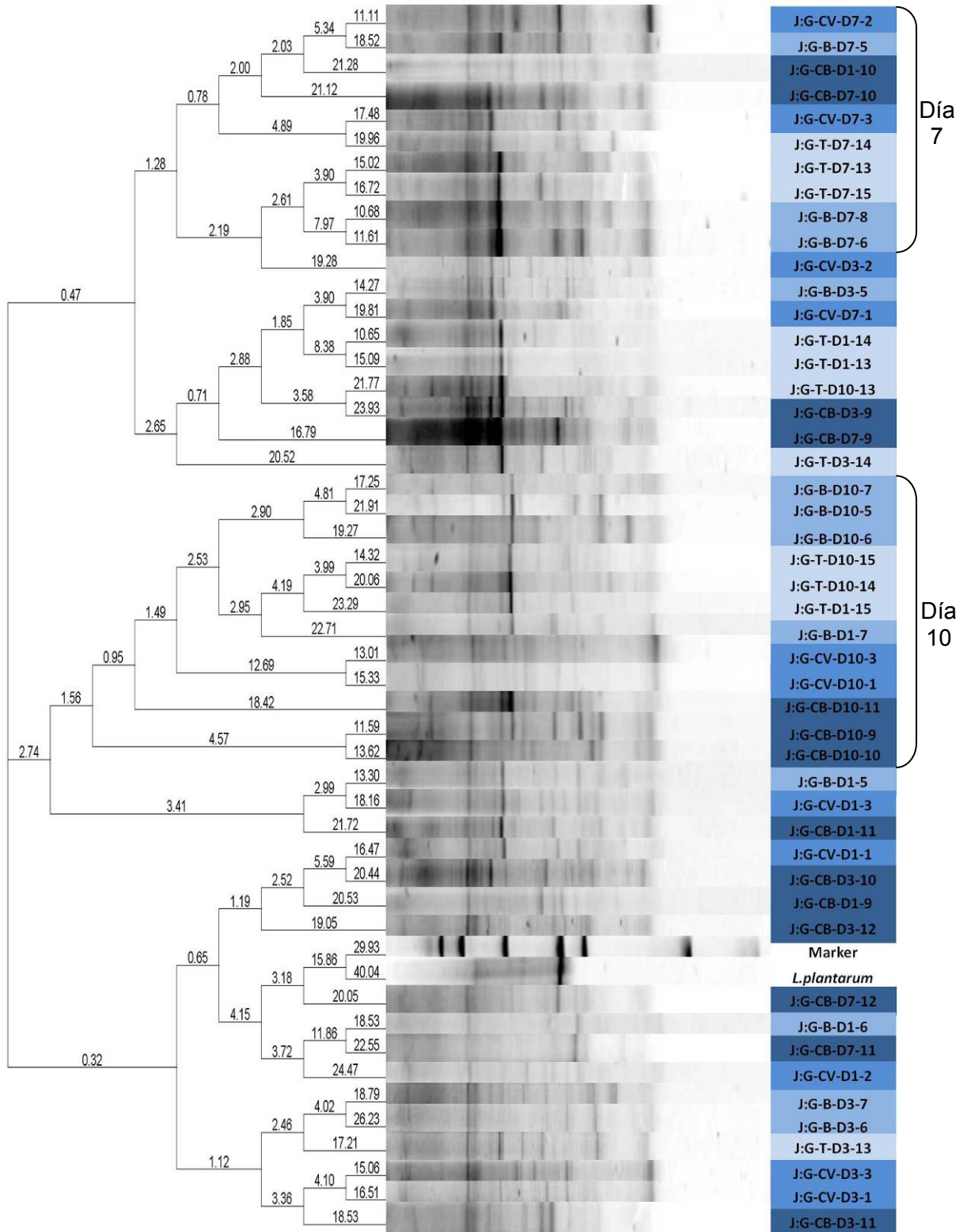


Fig.66 Análisis en TTGE de muestras fecales del estudio de Jamilano:Gelano

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

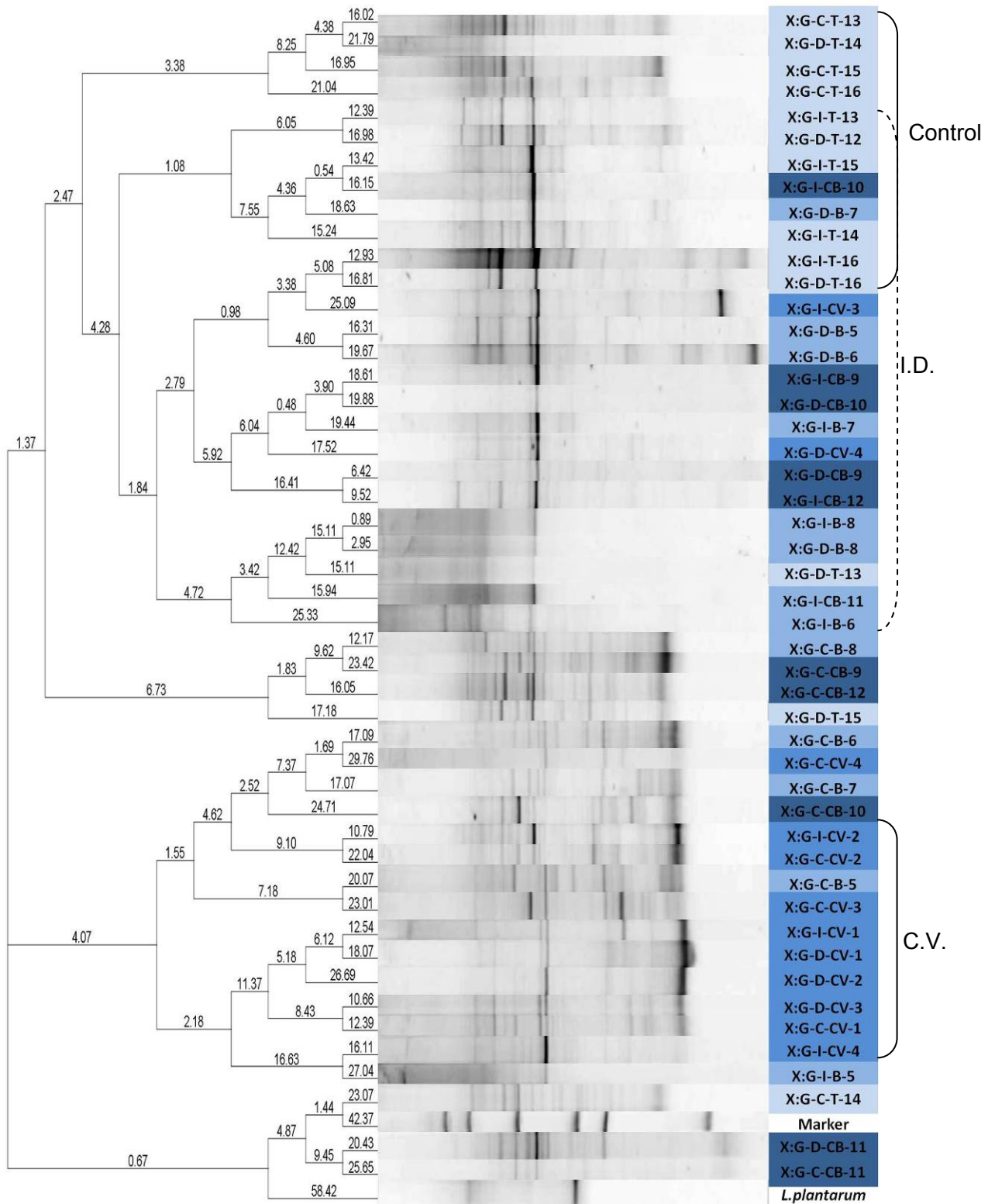


Fig. 67 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Xantano:Gelano

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

I.D.: Intestino delgado
C.V.: Cápsulas vacías

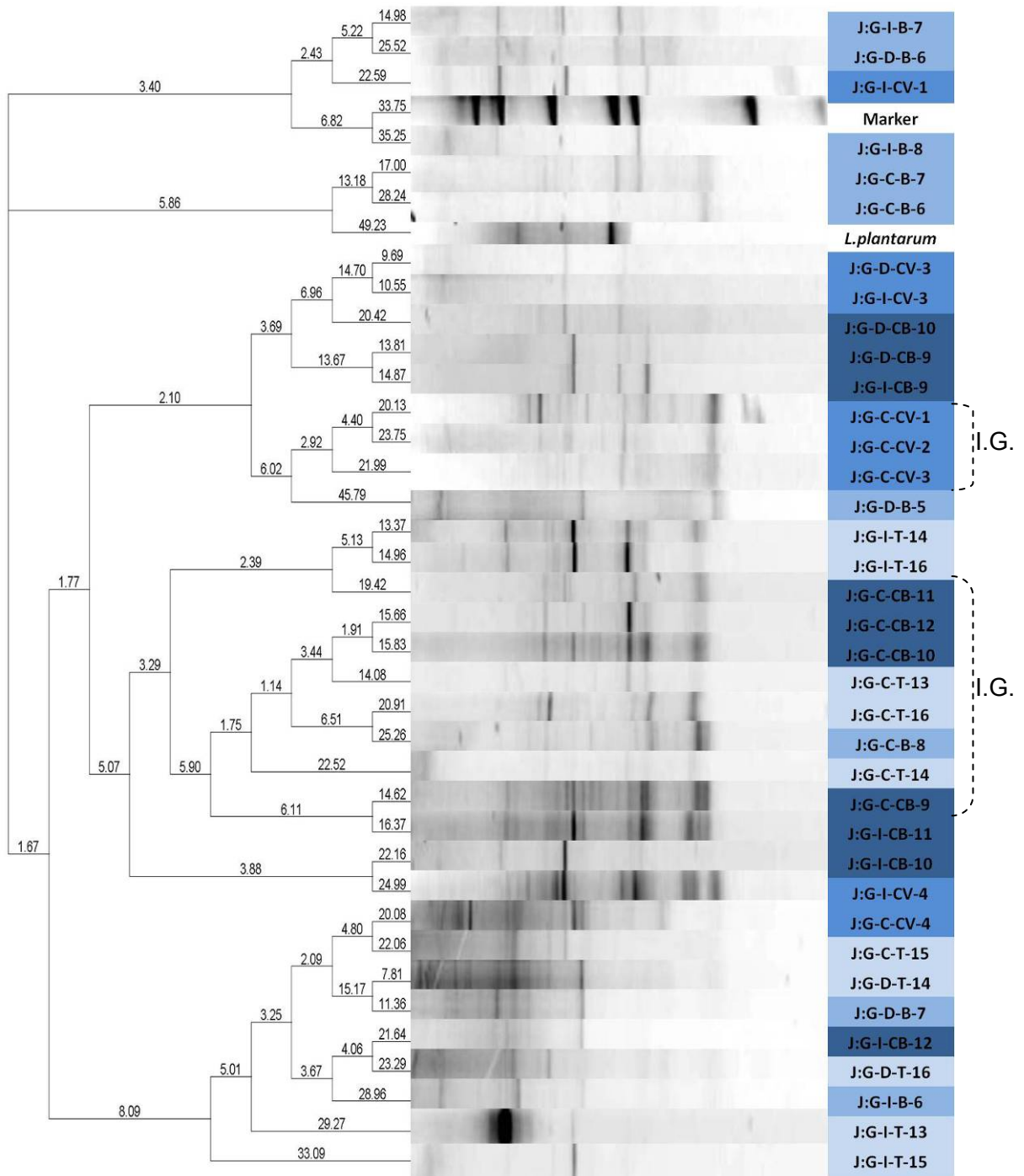


Fig. 68 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Jamilano:Gelano

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

I.G.: Intestino grueso

Por otro lado, en el estudio de la microbiota de órganos del tracto gastrointestinal, se observó en general una diversidad más dependiente del tipo de muestra, con una tendencia a presentar mayor diversidad de especies en las muestras del intestino grueso. De hecho, en el estudio de Xantano:Gelano, se observó un gran cluster formado únicamente por muestras procedentes del intestino delgado (duodeno e íleon), lo que podría estar en concordancia con los datos resultantes del estudio del número de bandas (apartado 4.3.2.2.A, Fig.62). Se observó también en este estudio, por un lado, un agrupamiento por tipo de tratamiento cuando se administraron las perlas de Xantano:Gelano sin cepa probiótica y, por otro lado, una tendencia de las muestras procedentes de animales control a agruparse. En el estudio de Jamilano:Gelano, no se observó agrupación clara por tratamientos o zona anatómica del tracto gastrointestinal, si bien la microbiota procedente de colon presentó perfiles más próximos entre sí. Este menor agrupamiento derivado de la administración de perlas de Jamilano:Gelano se observó también en la microbiota fecal, de manera que la administración de estas perlas, con o sin probiótico, podrían haber actuado en el mismo sentido en ambas microbiotas.

C-Identificación de especies presentes en los perfiles tras la administración de *L.plantarum* CRL 1815 encapsulado y sin encapsular.

Para una identificación más completa de las especies predominantes presentes en los perfiles previamente analizados así como para la detección en su caso del microorganismo administrado, se realizó una identificación de las bandas más representativas y del lactobacilo putativo mediante la escisión de bandas del gel y re-amplificación del ADN eluído de las mismas con la pareja de cebadores U968-GC-F/L1401-R. Los productos de PCR así obtenidos se identificaron mediante secuenciación.

Las bandas escindidas y eluidas para la posterior amplificación de su ADN se muestran en las figuras 69, 70, 71 y 72. Las bandas generales del perfil escindidas son aquellas que se encuentran incluidas en el recuadro a la altura del nombre asignado, mientras que los putativos *L.plantarum* CRL 1815 aparecen señalizados con una flecha.

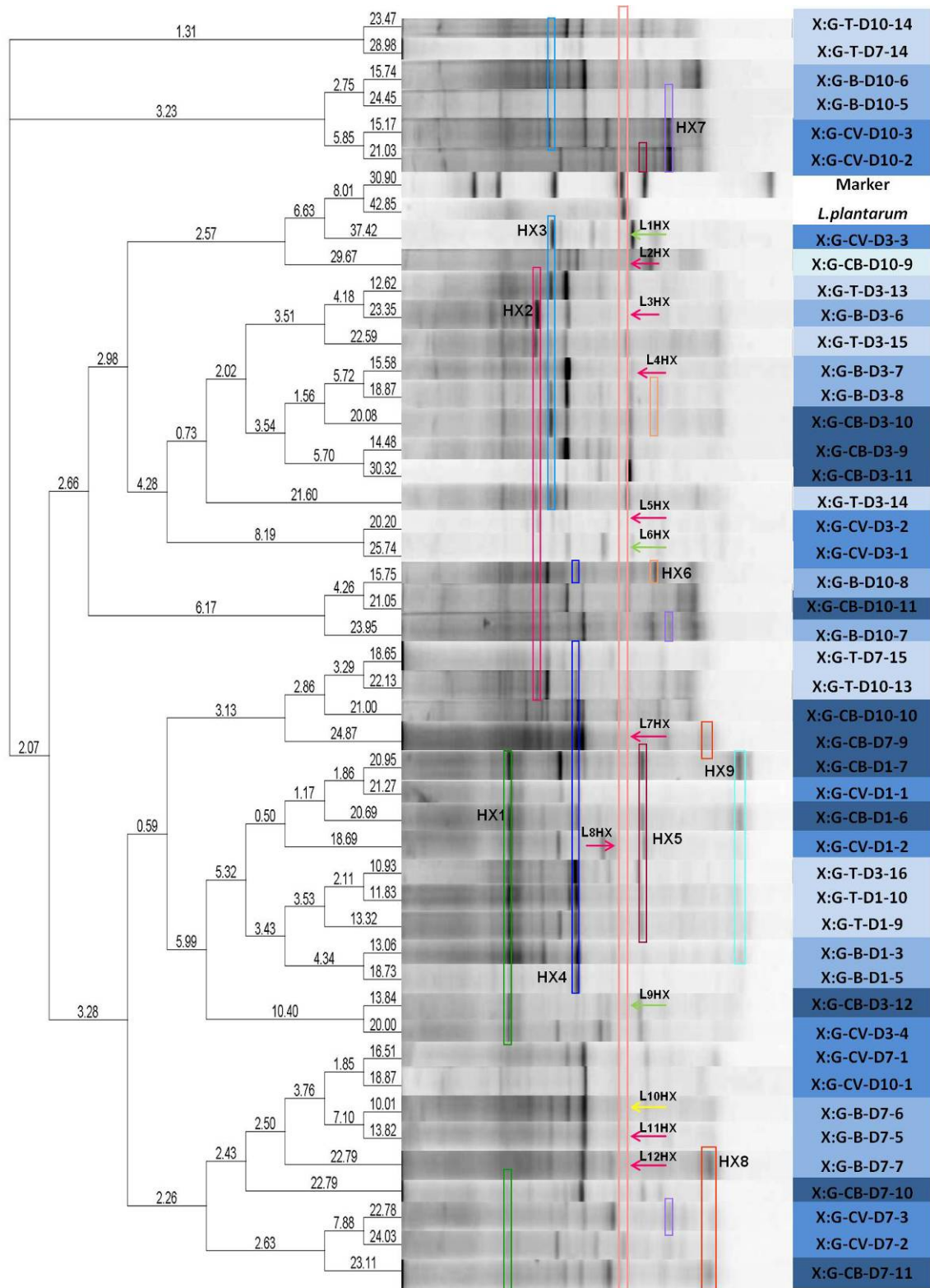


Fig. 69 Análisis en TTGE de muestras de heces del estudio de Xantano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida.

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

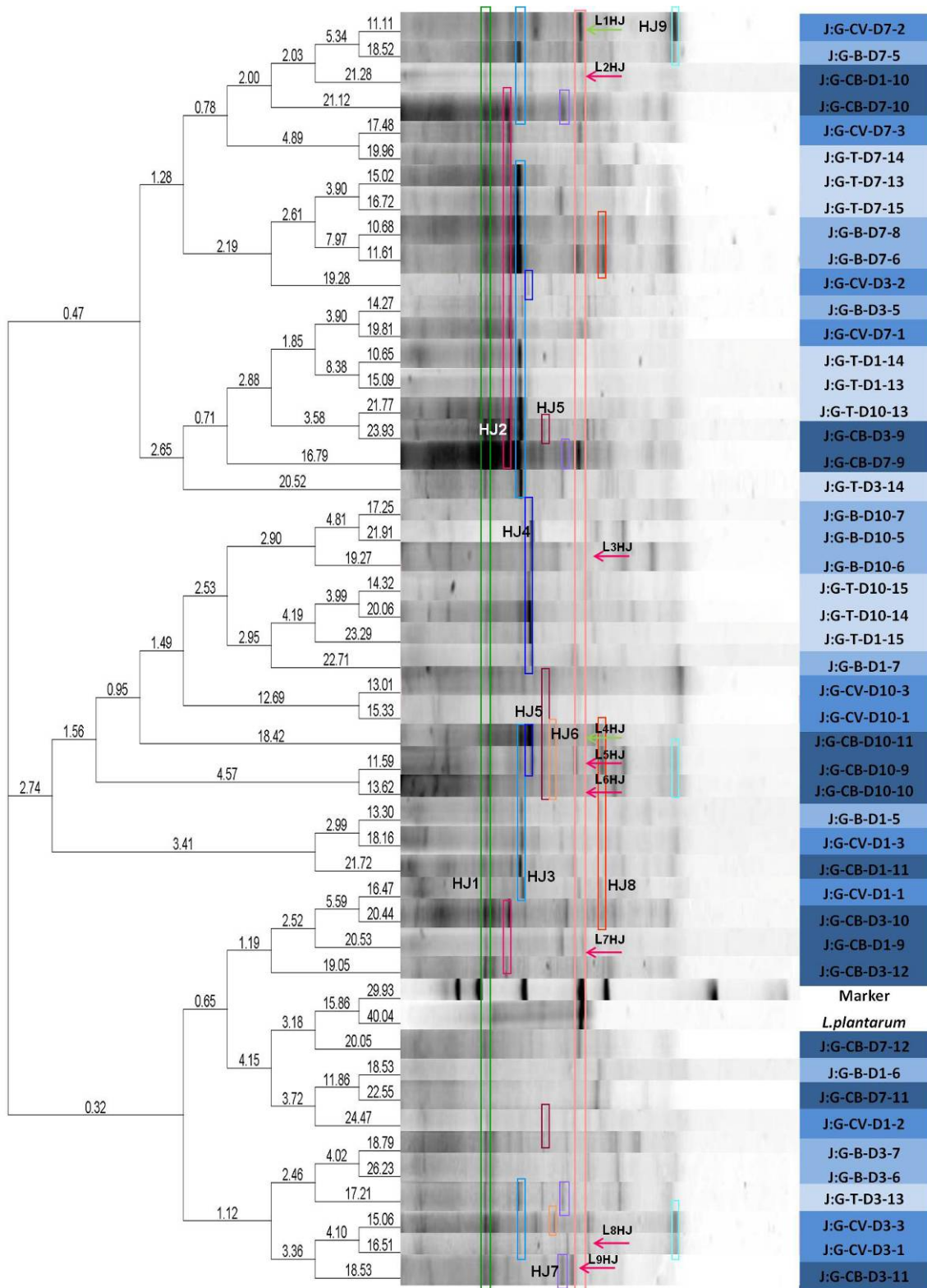


Fig. 70 Análisis en TTGE de muestras de heces del estudio de Jamilano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida.

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

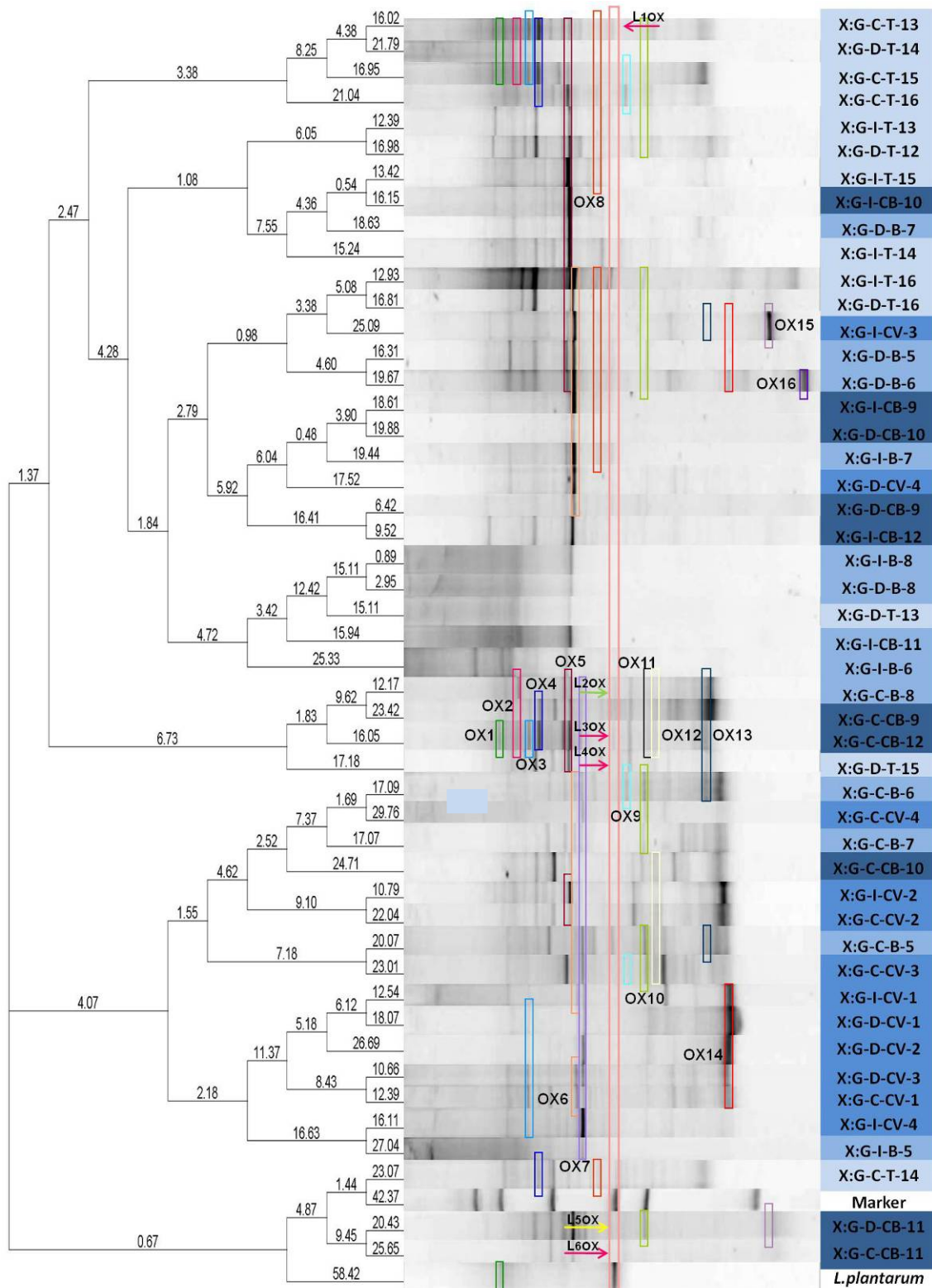


Fig. 71 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Xantano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida.

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

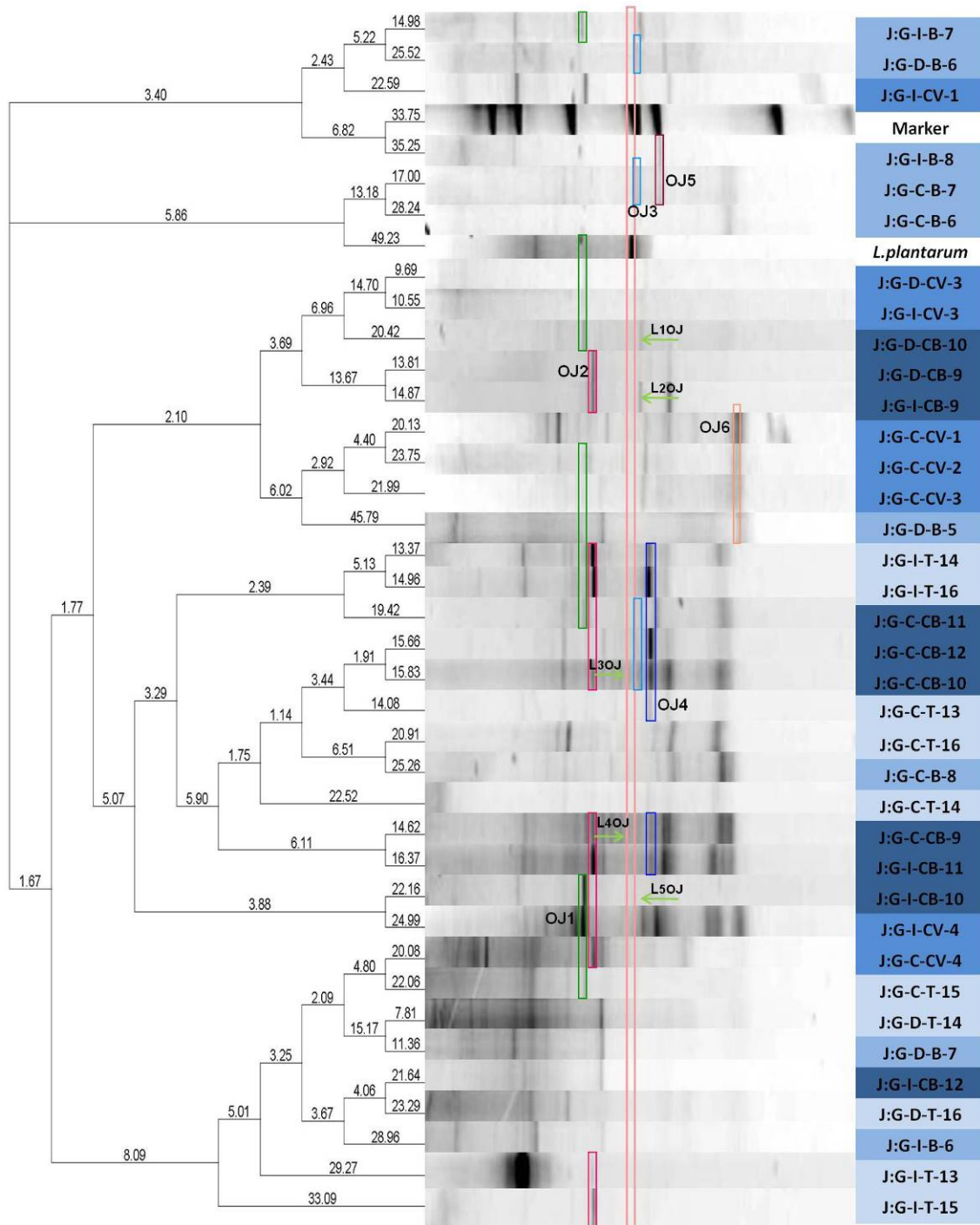


Fig. 72 Análisis en TTGE de muestras de órganos del estudio de Jamilano:Gelano. Recuadros indican bandas iguales a la escindida.

- Grupo Testigo
- Grupo Bacteria
- Grupo Cápsulas Vacías
- Grupo Cápsulas+Bacteria

Se escindieron y secuenciaron un total de 82 bandas, de las cuales 50 correspondieron a bandas mayoritarias del perfil global, mientras que las 32 restantes se escogieron entre aquellas que aparecieron al mismo nivel que *L.*

plantarum CRL 1815 en los geles de poliacrilamida. El análisis comparativo y búsqueda mediante la herramienta BLAST permitió identificar estas secuencias con un porcentaje de similitud igual o superior al 80%, siempre teniendo en cuenta que los fragmentos analizados estuvieron constituidos por unos 400 pb, longitud que no nos permite realizar una identificación categórica.

De las 50 bandas mayoritarias eluidas, finalmente resultaron 40 bandas únicas. La mayoría de estas secuencias, un 75%, correspondieron a "Uncultured bacteria" (Tablas 68 y 69). Este resultado está en concordancia con los obtenidos por Montesi *et al.* (2005), los cuales registraron un 73% de secuencias correspondientes a "Uncultured bacteria" en la microbiota cecal de ratas. Si analizamos la microbiota fecal y la asociada a los tejidos, el porcentaje de "Uncultured bacteria" en la microbiota fecal es sensiblemente superior (88,89%) al registrado para la microbiota asociada a los tejidos (63,64%). La dificultad para crear medios de cultivo adecuados para el crecimiento y aislamiento de microorganismos fecales asociado al desconocimiento de alrededor del 90% de la microbiota fecal murina y al empleo cada vez más amplio de técnicas moleculares en este campo (Salzman, *et al.*, 2002), podría ser la causa de la disponibilidad en las bases de datos de esta gran cantidad de bacterias no cultivables.

En las muestras fecales se observó una banda presente en todos los animales del estudio de Jamilano:Gelano (HJ1→Uncultured bacterium clone calf32_6wks_grp5_D09-*Eubacterium eligens* ATCC 27750), sin variaciones detectables entre grupos, lo que lleva a pensar que es una bacteria constitutiva de las heces que no se vio modificada por los diferentes tratamientos. En el estudio de Xantano:Gelano, sin embargo, se detectó una banda similar en un gran número de ellos el (HX1→Uncultured bacterium clone TS9_a02f09), banda que, aunque se detectó en distintos tratamientos, predominantemente apareció, y en mayor intensidad, en animales testigo o cuando las muestras procedían del día 1 (baseline), de manera que en este caso sí que podría verse afectado por los distintos tratamientos, aunque sin diferencias detectables en el gel entre los mismos.

Tabla 68. Resultados de secuenciación de bandas mayoritarias/Heces

Origen	Numero de banda	Especie más próxima (Accession number)	% similitud
Heces/X:G	HX1	Uncultured bacterium clone TS9_a02f09 (FJ372182.1)-16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP083587.1)- Uncultured Clostridiales bacterium clone (DQ144087.1)	90-90-90
	HX2	Uncultured bacterium clone K77S1_23g12 (EU451061.1)	92
	HX3	Uncultured bacterium clone DR5_113 (EU813492.1)-Uncultured bacterium clone C-18 16S (EU622701.1)	99-99
	HX4	Uncultured bacterium gene (AB506399.1)-Uncultured bacterium clone 16slp124-3c09.p1k (GQ157398.1)	99-99
	HX5	Uncultured bacterium clone R-9025 (FJ881025.1)- <i>Robinsoniella peoriensis</i> strain CCUG 52336 (DQ681227.1)	97-93
	HX6	Uncultured bacterium clone DP2_21 16S (EU813183.1)- Uncultured bacterium clone R-7596 (FJ880923.1)	98-98
	HX7	Uncultured bacterium clone R-8207 (FJ881215.1)-Uncultured bacterium clone DP1_22 (EU813014.1)	97-97
	HX8	Uncultured bacterium clone MD19_aaa04h07 (EU506591.1)- <i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835 (CP001071.1)	95-94
	HX9	Uncultured organism clone UUAV6CH121 (HM478932.1)-Uncultured <i>Akkermansia</i> sp. Clone (FJ538174.1)	100-100
Heces/J:G	HJ1	Uncultured bacterium clone calf32_6wks_grp5_D09 (GQ448163.1)- 16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP083012.1)/ <i>Eubacterium eligens</i> ATCC 27750 (CP001104.1)	85-84-83
	HJ2	16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP076291.1)	88
	HJ3	Uncultured bacterium clone K77S1_23g12 (EU451061.1)/ Uncultured bacterium clone H74N2_63b08 (EU457977.1)/Uncultured bacterium clone DR5_113 (EU813492.1)- Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone M6-81-R (EU530441.1)/ Uncultured bacterium clone DR5_113 (EU813492.1)-Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone M6-81-R (EU530441.1)	91/89/98- 93/99-94
	HJ4	Uncultured bacterium clone DR5_113 (EU813492.1)-Uncultured <i>Ruminococcus</i> sp. clone M6-81-R (EU530441.1)/Uncultured bacterium clone C-18 (EU622701.1)	99-94/96
	HJ5	Uncultured bacterium isolate (EU624100.1)-Uncultured <i>Lachnospiraceae</i> bacterium clone (EU794139.1)- 16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP083152.1)	80-84-85
	HJ6	Uncultured bacterium clone SWPT18_aaa03f08 (EF097243.1)	93
	HJ7	Uncultured bacterium clone COL_aai14a05 (EU774434.1)- <i>Clostridium citroniae</i> strain RMA 16102 (DQ279737.1) /Uncultured bacterium clone ML_aaj28b01 (EU461740.1) /Uncultured bacterium clone L-132 (EU622674.1)- Uncultured bacterium clone ML_aaj28b01 (EU461740.1)	92-91/89/96- 93
	HJ8	Uncultured bacterium clone R-9025 (FJ881025.1)- <i>Robinsoniella peoriensis</i> strain CCUG 52336 (DQ681227.1)/ Uncultured bacterium clone DP2_21 (EU813183.1)	96-93/98
	HJ9	Uncultured bacterium clone S4-204 (GQ898847.1)	100

/: Separación entre bandas
-: Separación entre resultados de una misma banda

Por otro lado, en el estudio de Xantano:Gelano, se detectó la aparición de una banda cuando se administraron las perlas, con y sin probióticos, al séptimo día, de una bacteria correspondiente a Uncultured bacterium clone MD19_aaa04h07-*Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835 (HX8), lo que podría estar relacionado con un posible efecto estimulador del crecimiento de este microorganismo por parte de los polímeros empleados..

En la microbiota asociada a los órganos, el porcentaje de bacterias no cultivables detectadas fue inferior a la fecal, habiéndose incluso detectado una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* en uno de los animales. Por otro lado, de todas las secuencias analizadas, solo 2 clones de bacterias asociadas a los órganos también estuvieron presentes en la microbiota fecal, Uncultured bacterium clone K77S1_23g12 y Uncultured bacterium clone R-9025. Por tanto, existirían diferencias entre la microbiota fecal y la asociada a los tejidos, hecho que aparece igualmente constatado en los estudios de Lepage, *et al.* (2005) y Zoetendal, *et al.* (2002) en humanos.

En las secuencias analizadas de la microbiota asociada al tejido gastrointestinal, se encontraron 2 parejas de secuencias que identificaban al mismo microorganismo, parejas de secuencias ambas que tuvieron patrones de migración diferentes. Estas secuencias fueron las correspondientes a las bandas OX3 y OX4, cuya especie más próxima con un 89% de similitud fue la bacteria relacionada con el “Uncultured bacterium clone K77S1_23g12” y las correspondientes a las bandas OX14 y OX15, cuya especie más próxima con un 100 y un 99% de similitud, respectivamente, fue *Bacillaceae bacterium* S4102D4. Como hemos dicho anteriormente, sus secuencias fueron diferentes, hecho reflejado por su diferente patrón de migración y, en el caso de las bandas OX14 y OX15, por su diferente porcentaje de similitud; por lo tanto la explicación a esta coincidencia en la búsqueda en BLAST la podríamos encontrar, por un lado, en la corta secuencia estudiada (400 pb aproximadamente), que no permitiría una identificación precisa, y por otro lado, por una ausencia en la citada base de datos de secuencias más próximas a ellas (Montesi, *et al.*, 2005).

Tabla 69. Resultados de secuenciación de bandas mayoritarias/Órganos

Origen	Numero de banda	Especie más próxima (Accession number)	% similitud
Órganos/X:G	OX1	<i>Staphylococcus</i> spp. 196 (GQ222244.1)/ Uncultured bacterium clone aaa53e12 (DQ818133.1)	91-91
	OX2	Uncultured bacterium clone 11S_02b10 (FJ382690.1)	80
	OX3	Uncultured bacterium clone K77S1_23g12 (EU451061.1)	89
	OX4	Uncultured bacterium clone p-2169-s959-3 (AF371669.1)- Uncultured bacterium clone K77S1_23g12 (EU451061.1)	89-89
	OX5	Uncultured bacterium clone TS8_a04c10 (FJ371973.1)/ Uncultured bacterium clone R-9689 (FJ880639.1)- Uncultured bacterium clone TS8_a04c10 (FJ371973.1)	98/97-97
	OX6	<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i> strain YKJ-101 (NR_025643.1)	95
	OX7	Uncultured bacterium clone Adhuhiec-i1a03 (GQ338693.1)/ Uncultured bacterium clone S2-86 (GQ898369.1)-Uncultured Clostridiales bacterium clone M5-84F (EU530408.1)	98/86-86
	OX8	Uncultured bacterium clone DP1_164 (EU813156.1)	91
	OX9	Uncultured bacterium clone 16slp123-1g10.p1k (GQ158510.1) - <i>Escherichia coli</i> BL21 (AM946981.1)/Uncultured bacterium clone L-137(3) (EU622773.1)	85-85/94
	OX10	Uncultured bacterium clone R-8744 (FJ880145.1)- <i>Robinsoniella peoriensis</i> strain HGUE-09/9434 (GU322806.1)	98-94
	OX11	Uncultured bacterium clone K74N3_78g10 (EU452417.1)	91
	OX12	16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP080393.1)-Uncultured bacterium clone orang2_aai67c02 (EU777620.1)	76-75
	OX13	Uncultured bacterium clone K78S4_32h06 (EU457040.1)	80
	OX14	<i>Bacillaceae</i> bacterium S4102D4 (GU111727.1)	100
	OX15	<i>Bacillaceae bacterium</i> S4102D4 (GU111727.1)	99
	OX16	<i>Bifidobacterium animalis subsp. animalis</i> strain TEEV 9 (GQ913435.1)	100
Órganos/J:G	OJ1	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band G I1 (HM070836.1)- Uncultured bacterium clone R-8288 (FJ881289.1)	95-95
	OJ2	Uncultured bacterium clone 3-1B-H24 (FJ677069.1)- <i>Clostridium lituseburense</i> strain H17 (EU887828.1)	99-99
	OJ3	Uncultured bacterium clone DR4_64 (EU813356.1)- <i>Robinsoniella peoriensis</i> strain HGUE-09/9434 (GU322806.1)	98-93
	OJ4	Uncultured bacterium clone R-9025 (FJ881025.1)- <i>Robinsoniella peoriensis</i> CCUG 52336 (DQ681227.1)	98-94
	OJ5	<i>Escherichia coli</i> strain 12 (HM007573.1)	99
	OJ6	Uncultured organism clone UUAV6CH121 (HM478932.1)-Uncultured <i>Akkermansia</i> sp. clone 671 (FJ538174.1)	99-99

/: Separación entre bandas

-: Separación entre resultados de una misma banda

Las secuencias obtenidas de las bandas que se situaron al mismo nivel que *L. plantarum* CRL 1815 se analizaron, del mismo modo que para las bandas del perfil global, mediante la herramienta BLAST. Los resultados de este análisis se reflejan en las tablas 70 y 71.

Tabla 70. Resultados de secuenciación de bandas escindidas del putativo *L.plantarum* CRL 1815

Origen	Numero de banda	Especie más próxima (Accession number)	% similitud	
Órganos/X:G	C-T	L10X	Uncultured bacterium clone L-137(3) (EU622773.1)	92
	C-B	L20X	Uncultured bacterium clone L-137(3) (EU622773.1)	82
	C-CB	L30X	Uncultured rumen bacterium clone L406RC7-A11 (GU304015.1)- 16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP077266.1)	91-90
	D-T	L40X	Uncultured bacterium clone R-9187 (FJ878986.1)	81
	D-CB	L50X	No similarity found	
	C-CB	L60X	Uncultured bacterium clone DR5_180 (EU813559.1)- Uncultured bacterium clone R-6329 (FJ879277.1)	77-76
Órganos/J:G	D-CB	L10J	Uncultured bacterium clone R-9025 (FJ881025.1)-Uncultured Clostridiales bacterium clone (EF434345.1)	95-92
	I-CB	L20J	<i>Escherichia coli</i> gene (AB272346.1)- Uncultured bacterium clone S1-165 (GQ898233.1)	99-99
	C-CB	L30J	16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP083823.1)- Uncultured bacterium clone GZ_aaa04e03 (EU470294.1)	86-85
	C-CB	L40J	Uncultured bacterium clone R-8291 (FJ881292.1)	84
	I-CB	L50J 1*	Uncultured bacterium clone 3-5O5 (FJ675950.1)- <i>Escherichia coli</i> gene (AB548582.1)	100-99
	I-CB	L50J 2*	<i>Lactobacillus pentosus</i> gene NRIC 0413 (AB362677.1)- <i>Lactobacillus plantarum</i> strain RG072 (HM192798.1)- Uncultured bacterium clone B07DF50 (EU879216.1)	95-94-95
		<i>Lactobacillus</i> banda TTGE	<i>Lactobacillus arizonensis</i> partial 16S rRNA gene, strain NRRL B-14770 (AJ965484.1)- <i>Lactobacillus plantarum</i> strain RG072 (HM192798.1)	99-98

*Ambas bandas estaban muy próximas, por lo que se les asignó la misma nomenclatura pero distinguiéndolas mediante un número anexo

Tabla 71. Resultados de secuenciación de bandas escindidas del putativo *L. plantarum* CRL 1815

Origen	Numero de banda	Especie más próxima (Accession number)	% similitud	
Heces/ X:G	CV-D3	L1HX	Uncultured bacterium clone PM1_a03b06 (GQ493340.1)- <i>Clostridium</i> sp. DSM 6877 (X76747.1)	93-93
	CB-D10	L2HX	Uncultured bacterium clone H74N2_61b02 (EU457905.1)- Uncultured bacterium clone K74N1_22b08 (EU457282.1)	96-96
	B-D3	L3HX	Uncultured bacterium clone K74N1_22b08 (EU457282.1)	86
	B-D3	L4HX	16S rDNA sequence amplified from human fecal simple (FP081206.1)-Uncultured bacterium clone SWPT5_aaa04e03 (EF1000841)	85-84
	CV-D3	L5HX	Uncultured bacterium clone SWPT5_aaa04e03 (EF1000841)- Uncultured bacterium clone R-6431 16S (FJ880002.1)	87-87
	CV-D3	L6HX	Uncultured bacterium clone R-8819 (FJ880217.1)- <i>Clostridium</i> sp. DSM 6877 (X76747.1)	91-90
	CB-D7	L7HX	Uncultured bacterium clone WD11_aak23c02 (EU509892.1)- Uncultured bacterium clone R-9025 (FJ881025.1)	84-83
	CB-D3	L8HX	Uncultured bacterium clone H79S2_09g11 (EU457688.1)- Uncultured bacterium clone R-9025 (FJ881025.1)- Uncultured Clostridiales bacterium clone (EF434345.1)	84-83-83
	B-D7	L9HX	No similarity found	
	B-D7	L10HX	Uncultured bacterium clone R-6329 (FJ879277.1)-Uncultured bacterium clone SWPT5_aaa04e03 (EF1000841)	80-80
	B-D7	L11HX	16S rDNA sequence amplified from human fecal sample (FP081206.1)	77
Heces/ J:G	CV-D7	L1HJ	Uncultured bacterium clone R-9025 (FJ881025.1)-Uncultured Clostridiales bacterium clone (EF434345.1)	98-93
	CB-D1	L2HJ	Uncultured bacterium clone R-8905 (FJ880298.1)	97
	B-D10	L3HJ	Uncultured bacterium clone IL-10-CONTROL-H6-T7promoter (EF407311.1)	87
	CB-D10	L4HJ	Uncultured bacterium clone L-132 (EU622674.1)-	98-94
	CB-D10	L5HJ	Uncultured bacterium clone DP2_21 (EU813183.1)	95
	CB-D10	L6HJ	Uncultured bacterium clone infected_14days-C2 (EF406730.1)- Uncultured bacterium clone R-8207 (FJ881215.1)	86-85
	CB-D1	L7HJ	Uncultured bacterium clone R-8905 (FJ880298.1)	97
	CV-D3	L8HJ	Uncultured bacterium clone rag6_aaa02a09 (EU506077.1)- Uncultured bacterium clone R-1319 (DQ777928.1)	88-88
	CB-D3	L9HJ	Uncultured bacterium clone R-8905 (FJ880298.1)	97
	Lactobacillus s banda TTGE	<i>Lactobacillus arizonensis</i> partial 16S rRNA gene, strain NRRL B- 14770 (AJ965484.1)- <i>Lactobacillus plantarum</i> strain RG072 (HM192798.1)	99-98	

Si se observan los resultados de secuenciación de las bandas que se detectaron al nivel de *L. plantarum* CRL 1815, aunque no fue posible detectar

esta cepa probiótica a nivel de heces, sí se detectó este microorganismo asociado a la microbiota de órganos cuando se administró inmovilizado en perlas de Jamilano:Gelano (L5OJ 2). Esta identificación mediante la herramienta BLAST se vio reforzada tras la realización de un árbol filogenético realizado con estas secuencias en referencia a cepas tipo y en el cual también se introdujo la secuencia obtenida tras la elución de la banda correspondiente a *L. plantarum* CRL 1815 que se introdujo en los geles de poliacrilamida para comprobar la validez de la identificación tras el paso de los fragmentos amplificados de 16S rRNA por la TTGE.

Se realizó un primer árbol filogenético en el que se introdujeron todas las secuencias y tras un cribado en el que se eliminaron aquellas secuencias que no podrían ser la cepa buscada debido a que pertenecían a grupos de administración en los cuales no estaba incluido *L. plantarum* CRL 1815 (Grupos Testigo y Cápsulas Vacías), finalmente se seleccionaron las secuencias más próximas. El árbol filogenético resultante se muestra en la figura 73, en el cual la secuencia L5OJ2 correspondiente a *Lactobacillus plantarum* strain RG072, aparece más próxima a las secuencias de *L. plantarum* y separada del resto de secuencias de bandas escindidas, las cuales se encuentran asociadas entre sí y más próximas a otras especies del género *Lactobacillus*.

Dentro de estas bandas más lejanas a *L. plantarum*, existe un porcentaje ampliamente mayoritario de bacterias no cultivables con porcentajes de similitud variables que van desde el 82 al 98%, con excepción de L5OJ 1 y L2OJ, secuencias que muestran máxima similitud con *E. coli* según la base de datos BLAST. Estas secuencias L5OJ 1 y L2OJ, se encuentran muy próximas a las del género *Lactobacillus* en el árbol filogenético, lo que indicaría una gran similitud en sus secuencias. Este hecho podría ser motivo de que migraran de manera muy próxima a *L. plantarum* CRL 1815 en los geles de poliacrilamida, lo cual junto con el gran número de bandas pertenecientes a la microbiota total presentes en cada una de las muestras, dificultaría la detección y escisión de la cepa probiótica al confundirla con bandas muy próximas.

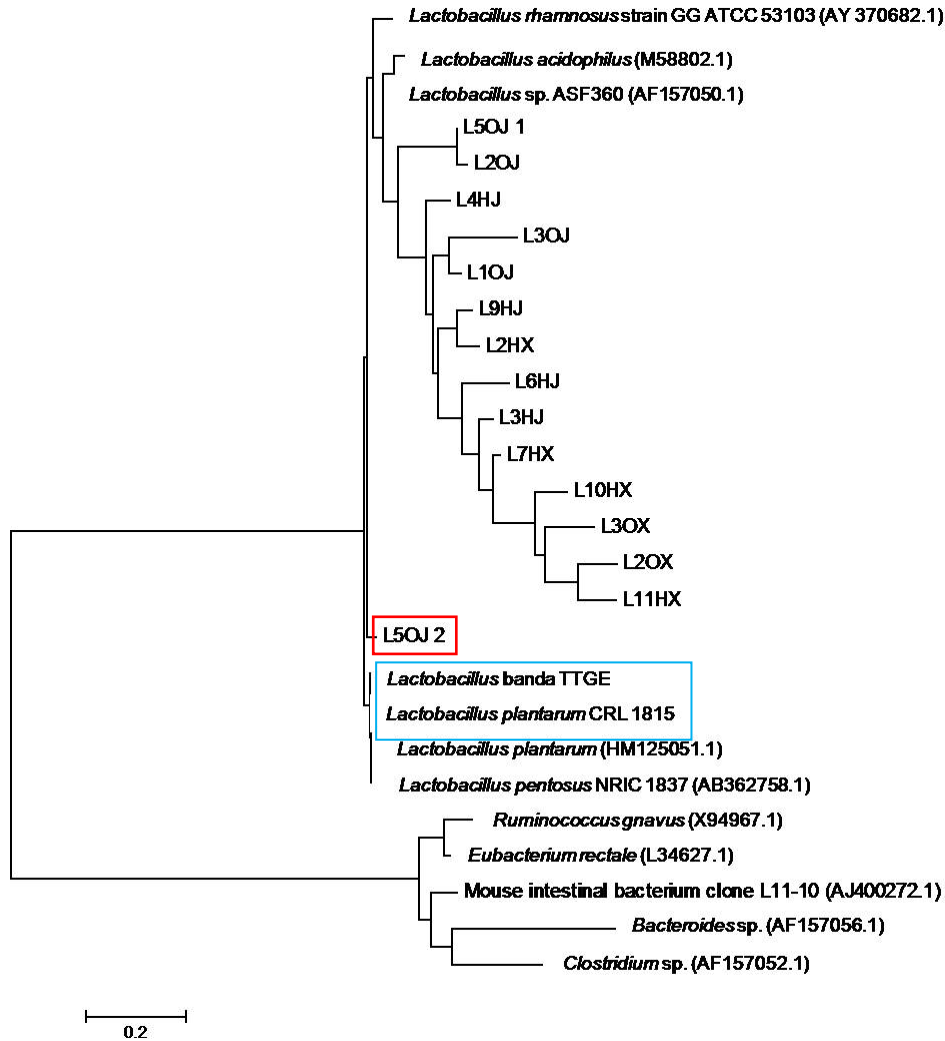


Fig. 73 Árbol filogenético realizado con las secuencias más próximas obtenidas de muestras fecales y de órganos del putativo *L.plantarum* CRL 1815

De este modo y a la vista de todos los resultados obtenidos en el estudio de colonización y tránsito gastrointestinal podemos decir que, aunque mediante el análisis del número de bandas (apartado 4.3.2.2.A) se detectó un efecto de los diferentes tratamientos sobre la diversidad de la microbiota a nivel cualitativo, este efecto no pudo confirmarse mediante el análisis de los perfiles filogenéticos (apartado 4.3.2.2.B), en donde no se observó un claro efecto de los diferentes tratamientos sobre la microbiota fecal y la asociada a órganos, sino que el efecto sobre la misma estuvo más asociado al tiempo de administración y al tipo de órgano analizado. En este sentido, la amplia cantidad de bacterias no cultivables detectadas, unido a la talla de la secuencia estudiada (400 pb aproximadamente), que limitaría la identificación, y a una

ausencia en la base de datos BLAST de secuencias más próximas a las analizadas, limitó al análisis cualitativo del perfil global de la microbiota, tal y como describen otros autores como (Montesi, *et al.*, 2005).

Sin embargo, a pesar de estos datos y de las limitaciones propias de la TTGE (detección sólo de los grupos microbianos presentes en un porcentaje mayor al 1% en la microbiota y solapamiento de algunas bandas detectadas mediante análisis bioinformático con el software Chromas lite versión 2.01), fuimos capaces de detectar la presencia de la cepa probiótica en la microbiota asociada a uno de los animales, cuando fue administrada inmovilizada en perlas de Jamilano:Gelano. Aunque se trata un resultado aislado debido a su detección en un único animal, sí resulta esperanzadora la aparición de esta cepa colonizando un órgano cuando se administró inmovilizada y no libre, mostrando el posible efecto protector de la inmovilización en polímeros microbianos, y especialmente con la mezcla de Jamilano:Gelano.

Este resultado es aún más interesante si tenemos en cuenta, por un lado, la dificultad asociada a la detección de este microorganismo como parte de la microbiota total por el empleo de cebadores universales y no específicos del género *Lactobacillus* y, por otro, por el carácter preliminar de este estudio, de manera que habiendo obtenido este resultado positivo, en estudios posteriores sería interesante modificar condiciones de administración como dosis, duración del tratamiento, recogida de muestras fecales tras el cese del tratamiento y empleo de cebadores universales y específicos para lactobacilos, por ejemplo.

4.3.3 Evaluación de la respuesta biológica derivada de la administración de perlas de *L.plantarum* CRL 1815.

Tras la administración oral diaria durante 10 días de perlas de Xantano:Gelano (0,75%:1%) y Jamilano:Gelano (1%:1%), con y sin probiótico inmovilizado, así como también de la cepa probiótica *L. plantarum* CRL 1815 sin inmovilizar a ratas Wistar, los animales se sacrificaron al día siguiente y se extrajeron los bazos. Los esplenocitos obtenidos de los correspondientes bazos

se testaron frente a un mitógeno de células B (LPS) y a un mitógeno de células T (ConA), de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.5.4.1, para evaluar si existe algún tipo de inmunomodulación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 72.

Tabla 72. Resultados de la linfoproliferación en respuesta a mitógenos

Estudio	Tratamiento	LPS*	ConA*
Xantano:Gelano	Ninguno	0,033±0,030	0,080 0,049
	<i>L. plantarum</i> CRL 1815	0,065±0,004	0,159±0,034
	Perlas sin probiótico	0,049±0,016	0,121±0,073
	Perlas con probiótico	0,066±0,018	0,128±0,029
Jamilano:Gelano	Ninguno	0,076±0,041	0,158±0,071
	<i>L. plantarum</i> CRL 1815	0,054±0,044	0,096±0,023
	Perlas sin probiótico	0,057±0,065	0,110±0,047
	Perlas con probiótico	0,056±0,011	0,112±0,013

*Resultados de densidad óptica (570 a 630 nm) expresados como Media±DS

De acuerdo con estos resultados, ni la administración de la cepa probiótica ni los polímeros microbianos a las concentraciones que constituyen las perlas ni tampoco las combinación de ambas modificó la capacidad de los esplenocitos de proliferar en respuesta a los mitógenos frente a los que fueron expuestos, ya que no se encontraron diferencias significativas con respecto a los valores de proliferación del grupo control ni entre los grupos de administración testados. Por otro lado, no se registraron fluctuaciones entre los backgrounds procedentes de los diferentes animales, hecho que indicaría una ausencia de toxicidad asociada a la administración, tanto de perlas, independientemente del material de encapsulación empleado, como del microorganismo. Tampoco se observó esplenomegalia asociada a la administración de las perlas o la cepa probiótica.

La ausencia de toxicidad, tanto de *L. plantarum* CRL 1815 como de ambos tipos de perlas concuerda con el hecho de que el gelano y el xantano son sustancias reconocidas como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (US Food and Drug Administration), estando también permitidos por la EFSA (European Food Safety Authority) como aditivos alimentarios para su uso

como emulgentes, estabilizadores, espesantes y gelificantes; asimismo, los microorganismos del género *Lactobacillus* también son reconocidos como GRAS, de tal manera que se ha probado su ausencia de toxicidad y su seguridad para su empleo en productos alimentarios.

Por otro lado, estudios previos realizados por Ruiz-Bravo, *et al.* (2001) con jamilano en ratones, mostraron la ausencia de toxicidad aguda de este polímero microbiano. No se observaron efectos adversos en los animales empleados tras una dosis única de 10 mg/kg, sin embargo, con una dosis de 100 mg/kg se observó una disminución del peso del animal, efecto que desapareció el segundo día, así como también se observó la aparición de esplenomegalia en los animales de experimentación. La dosis de jamilano administrada en el presente estudio fue de aproximadamente 50 mg/kg, pero la vía de administración fue diferente, de manera que en nuestro caso se empleó la vía oral, mientras que en el mencionado estudio se empleó la vía intraperitoneal. Este hecho podría justificar que, empleando una dosis superior a 10 mg/kg, no se observaran efectos adversos de ningún tipo.

Aunque no existen datos sobre la capacidad inmunomoduladora del xantano y el gelano, sí se ha observado en estudios previos que el jamilano tiene un efecto supresor de la proliferación en respuesta a LPS y ConA (Ruiz-Bravo, *et al.*, 2001). Sin embargo, este efecto supresor, que se dio tras una sola dosis de polímero, desapareció tras 7 días de administración diaria del mismo, dato que concuerda con nuestros resultados, puesto que los datos recogidos en nuestro estudio hacen referencia al efecto del polímero tras una administración diaria durante 10 días.

Ciertas cepas probióticas presentan un efecto inmunomodulador cuando son administradas, como *L. rhamnosus* HN001 (Gill, *et al.*, 2000; Gill & Rutherford, 2001), *L. acidophilus* HN017 o *Bifidobacterium lactis* HN019 (Gill, *et al.*, 2000). Se han descrito también cepas de *L. plantarum* que tienen un efecto inmunomodulador (Herias, *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha visto que la presencia de estas propiedades inmunomoduladoras, así como su patrón de modulación, van a depender del tipo de especie bacteriana (Kirjavainen, *et al.*, 1999), de la cepa individual (Nagafuchi, *et al.*, 1999), del uso del microorganismo viable o inactivado (Gill, *et al.*, 2000) y de la dosis empleada (Gill, *et al.*, 2000).

La cepa de *L. plantarum* empleada en nuestro estudio, *L. plantarum* CRL 1815, no tuvo ningún efecto sobre la linfoproliferación en respuesta a LPS y ConA. De acuerdo con esto, se podría concluir que esta cepa de *L. plantarum* en concreto no presenta propiedades de modulación del sistema inmune. Un estudio con otra cepa de *L. plantarum* obtuvo resultados similares cuando se realizaron estudios de linfoproliferación frente a mitógenos, de manera que la cepa en cuestión no produjo ningún efecto significativo sobre ratones sanos (Bujalance, *et al.*, 2007).

Finalmente, podríamos concluir que la administración de las perlas, con y sin probiótico, independientemente del material de encapsulación empleado así como de la cepa de *L. plantarum* CRL 1815, no causó ningún efecto tóxico en los animales, lo que abriría el camino para una futura aplicación en productos alimentarios.

DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de la presente tesis se han discutido de forma específica y con apoyo bibliográfico los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos en cada una de las partes específicas de este trabajo de investigación, sin embargo se ha considerado conveniente y de utilidad presentar en este apartado un resumen global compilativo.

Los efectos beneficiosos sobre la salud humana asociados a los microorganismos probióticos han sido ampliamente reconocidos y demostrados mediante numerosos estudios desde la época de Metchnikoff hasta la actualidad (Saulnier, *et al.*, 2009; Vasiljevic & Shah, 2008). Actualmente, el empleo de bacterias del ácido láctico probióticas, principalmente de aquellas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se ha generalizado mediante su incorporación en productos lácteos, principalmente yogur. De hecho, parece existir una relación entre la presencia de probiótico y un aumento del consumo del producto, asociado a los efectos beneficiosos publicitados. Sin embargo, las cepas probióticas incorporadas en estos productos alimentarios pueden no llegar en cantidad suficiente al intestino grueso, normalmente su lugar de acción, debido a las condiciones desfavorables durante el almacenamiento en el producto y/o del tracto gastrointestinal superior. Es por ello que se están desarrollando con éxito técnicas como la de la microencapsulación, con el objetivo de ofrecer a las bacterias probióticas una protección física frente a estas condiciones desfavorables (Rokka & Rantamaki, 2010).

En otro orden, entre las funciones biológicas de los exopolisacáridos microbianos se encuentra la de ofrecer protección a las células que los producen frente a elementos diversos como la deshidratación, el ataque de protozoos o la acción de antibióticos. Del mismo modo contribuyen a la formación de biofilms, en muchas ocasiones esencial para la supervivencia de los microorganismos en determinados hábitats. Además, existen exopolisacáridos microbianos con una larga historia de uso en la industria alimentaria (véase xantano, gelano), garantizando su seguridad e inocuidad para el consumo humano. Todo ello, unido a la capacidad de algunos de estos polímeros de gelificar (Kumar, *et al.*, 2007), los hace un vehículo idóneo para la encapsulación de microorganismos probióticos.

Teniendo en cuenta todo esto, se planteó en este trabajo emplear técnicas de encapsulación para proteger determinadas cepas probióticas (*L.plantarum* CRL 1815, *L.rhamnosus* ATCC 53103 y *B. longum* ATCC BAA-999) y, para ello, los exopolisacáridos microbianos se presentaron como un material idóneo para ejercer de vehículo de los mismos.

Aunque no todos los polímeros microbianos fueron aptos para ejercer como matriz de encapsulación, se obtuvieron con éxito perlas de probióticos con 2 mezclas de polímeros: Jamilano:Gelano (1%:1%) y Xantano:Gelano (0,75%:1%). Resulta obvia la importancia del gelano en la formulación, siendo el agente clave gelificante que permite la formación de las perlas. Es para facilitar el manejo del polímero durante la encapsulación de probióticos (por ejemplo reduciendo su temperatura de gelificación) por lo que se mezcló con los restantes polímeros. Por otro lado se validó el empleo del generador electrostático de goteo para la encapsulación de las cepas probióticas empleadas. Esto es así porque los probióticos, tras la encapsulación, mantuvieron una concentración adecuada para su inclusión en alimentos y, principalmente, por la reducción de tamaño de las perlas alcanzada con esa técnica. A pesar de mantenerse dentro de valores normales para el método de goteo (Muthukumarasamy, *et al.*, 2006), supuso una reducción muy importante en el tamaño de las perlas, puesto que debido a las características de nuestras mezclas de polímeros el goteo tradicional generaba perlas excesivamente grandes.

Establecidos los parámetros de encapsulación, se hizo necesario estudiar el efecto protector de los materiales de encapsulación frente a diferentes condiciones. Los resultados obtenidos en todos los estudios *in vitro* arrojan como hecho principal que la viabilidad resultante de la exposición a condiciones adversas va a estar ampliamente condicionada por el tipo cepa empleada (Ding & Shah, 2007). Dicho esto, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 presentó un comportamiento anómalo, de reducción de la viabilidad al encapsularse, que podría estar relacionado con alguna interacción con los polímeros microbianos o a una acumulación de metabolitos tóxicos dentro de la matriz, pero cuya causa aún no ha sido elucidada.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios fueron dispares. Si bien la encapsulación no mejoraba la viabilidad microbiana durante el

almacenamiento al comparar los datos con los controles sin encapsular, se obtuvieron mayores recuentos a 25°C, posiblemente por un empleo de la matriz de encapsulación como fuente de carbono al encontrarse los microorganismos metabólicamente activos a esta temperatura. Tampoco se observó un efecto protector de la encapsulación a pH muy ácido en las condiciones de nuestro estudio. Sin embargo, y en contraposición a estos resultados, sí hubo una protección de las cápsulas frente a condiciones gastrointestinales simuladas, reflejada en una mayor viabilidad tras el choque frente a bilis simulada, significativa cuando el material de encapsulación empleado fue la mezcla polimérica de Xantano:Gelano (0,75%:1%).

Para manifestar sus efectos beneficiosos a nivel intestinal es deseable que las bacterias probióticas presenten algunas propiedades como la capacidad de auto-agregación, co-agregación, adhesión a las células epiteliales, producción de peróxido de hidrógeno o producción de bacteriocinas, propiedades que ayudan a la colonización del epitelio intestinal y a la competencia con microorganismos patógenos (Del Re, *et al.*, 2000; Espeche, *et al.*, 2009). Es importante que estas propiedades lleguen intactas al lugar de acción, por ello se estudió el efecto que la encapsulación y el paso por condiciones gastrointestinales simuladas podría ejercer sobre propiedades como la auto-agregación y la producción de peróxido de hidrógeno. Los resultados mostraron que ninguna de las cepas probióticas vio modificada su capacidad de auto-agregación, independientemente de la encapsulación o de las condiciones a las que estuvieron expuestas. En cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno, sólo *L. rhamnosus* ATCC 53103, la única productora, cuando difundió de la cápsula al medio perdió su capacidad de producción tras 24 horas de exposición en bilis simulada. Sería necesario un estudio en profundidad para dilucidar la causa de este cambio en el metabolismo microbiano.

Todo estos resultados *in vitro* irían en la línea de una protección efectiva de la viabilidad microbiana a través de la encapsulación sin modificar las características propias de cada cepa tras el paso por condiciones gastrointestinales simuladas. Sin embargo, es deseable que los resultados *in vitro* sean confirmados *in vivo* (Drouault-Holowacz, *et al.*, 2006). Es por ello que el siguiente paso fue la corroboración de estos resultados en modelos murinos.

Centrándonos en una sola cepa, aquella que dio mejores resultados de viabilidad *in vitro*, *L.plantarum* CRL 1815, se estudió el posible efecto protector de la encapsulación con los diferentes polímeros empleados.

El impacto que esta administración tuvo sobre la microbiota fecal de las ratas empleadas para el estudio fue cuantificado mediante FISH. En cuanto a la protección y detección de la bacteria probiótica, únicamente las perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%) mostraron resultados positivos, más homogéneos incluso que cuando se administró la cepa sin encapsular. Del mismo modo, estas perlas presentaron efectos moduladores sobre los principales grupos microbianos (*C.coccoides-E.rectale* y Clostridial cluster IX). Por otro lado, la administración de las perlas sin contenido bacteriano estimuló el crecimiento de los grupos microbianos estudiados. De acuerdo con esto, las perlas de ambas mezclas de polímeros, obtenidas únicamente a partir de polisacáridos, podrían haber actuado como “alimento” para la microbiota colónica, favoreciendo su crecimiento y aumento en número (Gibson & Roberfroid, 1995). Sin embargo, cuando las perlas contenían en su interior al probiótico encapsulado no se observó este efecto tan marcado, alterando la cepa probiótica el impacto de estos polisacáridos sobre la microbiota fecal.

Junto con este estudio del impacto sobre la microbiota fecal, se realizó un estudio de colonización y tránsito intestinal mediante la técnica TTGE. Aunque mediante esta técnica no pudimos observar un efecto claro y concluyente de los distintos tratamientos (perlas con o sin probiótico, probiótico sin encapsular y control) sobre la microbiota fecal y asociada a las paredes intestinales, mediante técnicas de secuenciación sí fuimos capaces de detectar la presencia de la cepa probiótica en la microbiota asociada a uno de los animales cuando fue administrada inmovilizada en perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%). Aunque se trata de un resultado aislado debido a su detección en un único animal, sí resulta esperanzadora la aparición de esta cepa colonizando un órgano cuando se administró inmovilizada y no libre, mostrando el posible efecto protector de la inmovilización en polímeros microbianos, y especialmente con la mezcla de Jamilano:Gelano.

Como vemos, existe una contradicción entre los datos *in vitro* e *in vivo*. Mientras que los datos *in vitro* otorgaban una mayor protección a las perlas de Xantano:Gelano (0,75%:1%), la valoración global de los datos *in vivo* se

inclinan a favor de las perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%). Este hecho vuelve a mostrar la importancia de realizar estudios *in vivo*, y si es posible en voluntarios humanos, para validar los resultados obtenidos *in vitro*.

Finalmente, los estudios de linfoproliferación en respuesta a mitógenos mostraron tanto la ausencia de actividad moduladora del sistema inmune como de toxicidad de la cepa probiótica y de las perlas con y sin probióticos, independientemente del material de encapsulación empleado. Este hecho abriría el camino a una futura aplicación en productos alimentarios por su inocuidad.

De esta forma, los resultados obtenidos y detallados en la presente memoria nos han llevado a las conclusiones que se exponen a continuación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo muestran que soluciones de gelano combinado con xantano y jamilano son aptas para la microencapsulación, siendo las concentraciones óptimas: Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%). El pululano es un polímero microbiano no apto para la encapsulación, por ser incapaz, combinado con gelano, de formar cápsulas completas.
2. El generador electrostático de goteo es un método válido para la microencapsulación de probióticos, permitiendo solventar problemas de tamaño excesivo en las perlas.
3. La microencapsulación de las cepas probióticas con Xantano:Gelano (1%:0,75%) y Jamilano:Gelano (1%:1%) no ofrece ningún tipo de protección durante el almacenamiento ni frente a pH muy ácidos. Sin embargo, es capaz de ofrecer protección frente a condiciones gastrointestinales simuladas. Las perlas de Xantano:Gelano (1%:0,75%) son las que ofrecen una protección más elevada frente a dichas condiciones.
4. Las técnicas de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y de electroforesis desnaturalizante en gradiente temporal de temperatura (TTGE) resultan complementarias y útiles para el análisis de la comunidad microbiana de animales a los que se les administra microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos.
5. El tratamiento con *Lactobacillus plantarum* CRL 1815 en las condiciones ensayadas no originó cambios relevantes en la composición de la microbiota gastrointestinal de ratas, a excepción de las perlas de Jamilano:Gelano (1%:1%) que contenían este microorganismo, demostrando un efecto modulador sobre los grupos microbianos *C.coccoides-E.rectale* y Clostridial cluster IX.
6. *Lactobacillus plantarum* CRL 1815, cuando se administró encapsulada en Jamilano:Gelano (1%:1%) fue detectada en el íleon de uno de los animales, lo que induce a pensar que esta cepa podría tener capacidad de colonización intestinal. Este hecho parece sugerir también un posible efecto protector del material de encapsulación.

7. Existe una ausencia de toxicidad e inmunomodulación asociada a *Lactobacillus plantarum* CRL 1815 y a los polímeros microbianos empleados en la presente tesis. La ausencia de toxicidad abriría el camino hacia una posible aplicación en industria alimentaria.

CONCLUSIONS

1. Solutions of gellan gum combined with xanthan gum and jamilano are appropriate for microencapsulation, being the optimal ones: Xanthan:Gellan gum (1%:0.75%) and Jamilan:Gellan gum (1%:1%). The microbial polymer pullulan is not suitable for microencapsulation, as is unable to form complete beads when it is combined with gellan gum.
2. The electrostatic bead generator is a valid method for probiotic microencapsulation, solving problems associated with excessive beads size.
3. Microencapsulation of the probiotic strains with Xanthan:Gellan gum (1%:0.75%) and Jamilan:Gellan gum (1%:1%) offers no protection neither during storage nor against very acidic pH. However, it offers protection against simulated gastrointestinal conditions. Xanthan:Gellan gum (1%:0.75%) beads offers the highest protection against these conditions.
4. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and Temporal Temperature-gradient Gel Electrophoresis (TTGE) are complementary techniques, proven useful for microbial community analysis of animals fed with probiotics encapsulated with microbial polymers.
5. *Lactobacillus plantarum* CRL 1815 treatments, with the assayed conditions, did not cause relevant modifications on the rat gastrointestinal microbiota. Exception was found when it was administered encapsulated with Jamilan:Gellan gum (1%:1%), showing a modulatory effect on the microbial groups *C.coccoides-E.rectale* and Clostridial cluster IX.
6. *Lactobacillus plantarum* CRL 1815, administered encapsulated in Jamilan:Gellan gum (1%:1%), was detected on one animal ileum. This fact suggests a possible colonization ability associated to this strain, as well as a possible protective effect associated to the encapsulating material.
7. There is a lack of toxicity and immunomodulatory effects associated to *Lactobacillus plantarum* CRL 1815 and the microbial polymers administration. This lack of toxicity might enable its application on food industry.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F., Tomita, S., Yaeshima, T., & Iwatsuki, K. (2009). Effect of production conditions on the stability of a human bifidobacterial species *Bifidobacterium longum* in yogurt. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 715-720.
- Adhikari, K., Mustapha, A., & Grun, I. U. (2003). Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*, 68(1), 275-280.
- Aguilera, M., Monteoliva-Sanchez, M., Suarez, A., Guerra, V., Lizama, C., Bennasar, A., & Ramos-Cormenzana, A. (2001). *Paenibacillus jamilae* sp nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1687-1692.
- Aguilera, M., Quesada, M. T., del Aguila, V. G., Morillo, J. A., Rivadeneyra, M. A., Ramos-Cormenzana, A., & Monteoliva-Sanchez, M. (2008). Characterisation of *Paenibacillus jamilae* strains that produce exopolysaccharide during growth on and detoxification of olive mill wastewaters. *Bioresource Technology*, 99(13), 5640-5644.
- Aguilera, M., Náder, F., Monteoliva Sánchez, M., & Ramos Cormenzana, A. (En prensa). Probióticos y Aplicaciones "Ómicas": hacia la comprensión de los mecanismos moleculares de la interacción de los probióticos con el hospedador. In A. R. Cormenzana, M. M. Sánchez & M. E. N. Macías (Eds.), *Probióticos y Salud. Madrid, España: Díaz de Santos*.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.
- Anderson, T. F. (1951). Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 13, 130-133.
- Andrade, S., & Borges, N. (2009). Effect of fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* on plasma lipids of women with normal or moderately elevated cholesterol. *Journal of Dairy Research*, 76(4), 469-474.
- Apostolou, E., Pelto, L., Kirjavainen, P. V., Isolauri, E., Salminen, S. J., & Gibson, G. R. (2001). Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence in situ hybridization. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 30(3), 217-221.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902-912.
- Barrons, R., & Tassone, D. (2008). Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: A review. *Clinical Therapeutics*, 30(3), 453-468.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1-20.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 278-285.
- Berthier, F. (1993). On the screening of hydrogen peroxide-generating lactic-acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 16(3), 150-153.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44(1), 26-46.
- Bot, A., vanAmerongen, I. A., Groot, R. D., Hoekstra, N. L., & Agterof, W. G. M. (1996). Large deformation rheology of gelatin gels. *Polymer Gels and Networks*, 4(3), 189-227.

- Bujalance, C., Moreno, E., Jimenez-Valera, M., & Ruiz-Bravo, A. (2007). A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 28-34.
- Bylaite, E., Adler-Nissen, J., & Meyer, A. S. (2005). Effect of xanthan on flavor release from thickened viscous food model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3577-3583.
- Camelin, I., Lacroix, C., Paquin, C., Prevost, H., Cachon, R., & Divies, C. (1993). Effect of chelating agents on gellan gel rheological properties and setting temperature for immobilization of living bifidobacteria. *Biotechnology Progress*, 9(3), 291-297.
- Cano, P. G., & Perdigon, G. (2003). Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model. *Journal of Dairy Research*, 70(4), 433-440.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
- Cats, A., Kuipers, E. J., Bosschaert, M. A. R., Pot, R. G. J., Vandenbroucke-Grauls, C., & Kusters, J. G. (2003). Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 17(3), 429-435.
- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I., & Lacroix, C. (2004). Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an in vitro colonic fermentation model. *Microbial Ecology*, 48(1), 128-138.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1065-1073.
- Collic Jouault, S., Chevolut, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Siquin, C., Roger, O., & Fischer, A. M. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1528(2-3), 141-151.
- Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansri, L., & Augustin, M. (2006). Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2280-2282.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Champagne, C. P., Raymond, Y., & Tompkins, T. A. (2010). The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiology* 1-8.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27-35.
- Chao, S. H., Tomii, Y., Sasamoto, M., Fujimoto, J., Tsai, Y. C., & Watanabe, K. (2008). *Lactobacillus capillatus* sp. nov., a motile bacterium isolated from stinky tofu brine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2555-2559.
- Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F. C., Marzo, F., & Villaran, M. d. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Chiang, B. L., Sheih, Y. H., Wang, L. H., Liao, C. K., & Gill, H. S. (2000). Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(11), 849-855.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and

- evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3), 434-444.
- De Bruyne, K., Camu, N., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2009). *Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. and *Lactobacillus cacaonum* sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(1), 7-12.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballare, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garelo, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M., & Capurso, L. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38 Suppl 2, S248-255.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438-442.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., & Lynch, J. M. (1992). *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7), 514-527.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), M446-M450.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009a). Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 74(2), M100-M107.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009b). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Journal of Food Science*, 74(2), M53-M61.
- Doleyres, Y., Paquin, C., LeRoy, M., & Lacroix, C. (2002). *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1-2), 168-173.
- Doleyres, Y., Fliss, I., & Lacroix, C. (2004). Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnology Progress*, 20(1), 145-150.
- Drouault-Holowacz, S., Foligné, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., & Pot, B. (2006). Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: In vitro and in vivo considerations. *Clinical Nutrition*, 25(6), 994-1003.
- Ehrmann, M. A., Brandt, M., Stolz, P., Vogel, R. F., & Korakli, M. (2007). *Lactobacillus secaliphilus* sp. nov., isolated from type II sourdough fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 745-750.
- Endo, A., & Okada, S. (2007a). *Lactobacillus composti* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from a compost of distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 870-872.
- Endo, A., & Okada, S. (2007b). *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 708-712.
- Endo, A., Roos, S., Satoh, E., Morita, H., & Okada, S. (2008). *Lactobacillus equigenerosi* sp. nov., a coccoid species isolated from faeces of thoroughbred racehorses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 914-918.
- Espeche, M. C., Otero, M. C., Sesma, F., & Nader-Macias, M. E. F. (2009). Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology*, 135(3-4), 346-357.

- FAO/WHO (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ont. Canada.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44-61.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43(6), 1-8.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88, S39-S49.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., & Jurtshuk, P. (1992). How close is close- 16s rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1), 166-170.
- Franks, A. H., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., & Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3336-3345.
- Franz, G., & Alban, S. (1995). Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(6), 311-314.
- Fuentes, S. (2005). *Microbial Ecology of the Murine Gastrointestinal tract. Tesis doctoral*. University of Granada, Granada, Spain.
- Fuller, R. (1991). Probiotics in Human Medicine. *Gut*, 32(4), 439-442.
- García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., & Gomez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549-579.
- García Ribera, R. (2003). *Producción y caracterización del exopolisacárido "jamilano" obtenido a partir de Paenibacillus jamilae. Aplicaciones en la industria alimentaria. Tesis doctoral*. Universidad de Granada, Granada.
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D., & Reid, G. (2002). Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(1), 92-96.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the procaryotes *Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd edn, vol. 5. Edited by M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, & W. B. Whitman*. New York: Springer.
- Giavasis, I., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2000). Gellan gum. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(3), 177-211.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota - introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gibson, G. R., & Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, 130(2), 391S-395S.
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Prasad, J., & Gopal, P. K. (2000). Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition*, 83(2), 167-176.
- Gill, H. S., & Rutherford, K. J. (2001). Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *British Journal of Nutrition*, 86(2), 285-289.

- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Cross, M. L., & Gopal, P. K. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(6), 833-839.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., & Campieri, M. (2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 119(2), 305-309.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., & Campieri, M. (2003). Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 124(5), 1202-1209.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2802-2813.
- Gómez Zavaglia, A., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., & De Antoni, G. (2002). Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 794-799.
- Graff, S., Hussain, S., Chaumeil, J. C., & Charrueaul, C. (2008). Increased intestinal delivery of viable *Saccharomyces boulardii* by encapsulation in microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25(6), 1290-1296.
- Guyonnet, D., Schlumberger, A., Mhamdi, L., Jakob, S., & Chassany, O. (2009). Fermented milk containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 improves gastrointestinal well-being and digestive symptoms in women reporting minor digestive symptoms: A randomised, double-blind, parallel, controlled study. *British Journal of Nutrition*, 102(11), 1654-1662.
- Harmsen, H. J. M., Elfferich, P., Schut, F., & Welling, G. W. (1999). A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent *in situ* hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1), 3-12.
- Harmsen, H. J. M., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J. E., & Welling, G. W. (2000). Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4523-4527.
- Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., He, T., Degener, J. E., & Welling, G. W. (2002). Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2982-2990.
- Havenaar, R., & Huis In't Veld, J. H. J. (1992). *Probiotics: A general view*: Elsevier Science Publishers Ltd.; Elsevier Science Publishing Co., Inc.
- Herias, M. V., Hesse, C., Telemo, E., Midtvedt, T., Hanson, L. A., & Wold, A. E. (1999). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clinical and Experimental Immunology*, 116(2), 283-290.
- Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582-587.
- Hiraga, K., Ueno, Y., Sukontasing, S., Tanasupawat, S., & Oda, K. (2008). *Lactobacillus senmaizukei* sp. nov., isolated from Japanese pickle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(7), 1625-1629.
- Hirayama, K., & Rafter, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, 2(6), 681-686.
- Hojsak, I., Abdovic, S., Szajewska, H., Milosevic, M., Krznaric, Z., & Kolacek, S. (2010). *Lactobacillus* GG in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics*, 125(5), E1171-E1177.

- Hold, G. L., Schwiertz, A., Aminov, R. I., Blaut, M., & Flint, H. J. (2003). Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(7), 4320-4324.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & Huis in't Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *41*(2), 85-101.
- Hsiao, H. C., Lian, W. C., & Chou, C. C. (2004). Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(2), 134-139.
- Huurte, A., Laitinen, K., Rautava, S., Korkeamaki, M., & Isolauri, E. (2008). Impact of maternal atopy and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: a double-blind placebo-controlled study. *Clinical and Experimental Allergy*, *38*(8), 1342-1348.
- Irisawa, T., & Okada, S. (2009). *Lactobacillus sucicola* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (*Quercus* sp.) sap. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(11), 2662-2665.
- Iyer, A., Mody, K., & Jha, B. (2005). Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin*, *50*(3), 340-343.
- Iyer, C., & Kailasapathy, K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*, *70*(1), M18-M23.
- Iyer, C., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2005). Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in *ex vivo* porcine gastrointestinal contents. *Letters in Applied Microbiology*, *41*(6), 493-497.
- Jeun, J., Kim, S., Cho, S.-Y., Jun, H.-j., Park, H.-J., Seo, J.-G., Chung, M.-J., & Lee, S.-J. (2010). Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition*, *26*(3), 321-330.
- Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G. R., Rastall, R. A., & McCartney, A. L. (2010). Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. *Fems Microbiology Ecology*, *71*(2), 304-312.
- Johannsen, H., & Prescott, S. L. (2009). Practical prebiotics, probiotics and synbiotics for allergists: how useful are they? *Clinical and Experimental Allergy*, *39*(12), 1801-1814.
- Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, *59*(1-3), 101-106.
- Juarez Tomas, M. S., Wiese, B., & Nader-Macias, M. E. (2005). Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(6), 1383-1391.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *3*(2), 39-48.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Lwt-Food Science and Technology*, *39*(10), 1221-1227.
- Kashiwagi, T., Suzuki, T., & Kamakura, T. (2009). *Lactobacillus nodensis* sp. nov., isolated from rice bran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(1), 83-86.
- Kirjavainen, P. V., El-Nezami, H. S., Salminen, S. J., Ahokas, J. T., & Wright, P. F. A. (1999). The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, *26*(2), 131-135.
- Kitahara, M., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2010). *Lactobacillus similis* sp. nov., isolated from fermented cane molasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(1), 187-190.

- Kolb, H. (1955). Die Behandlung acuter Infekte unter dem Gesichtswinkel der Prophylaxe chronischer Leiden. Über die Behandlung mit physiologischen bakterien. *Microecology and Therapy*, 1, 15-19.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737-743.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. C. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *Lwt-Food Science and Technology*, 39(2), 177-183.
- Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides - A perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103-117.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Laiho, K., Hoppu, U., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: on-going research on atopic individuals. *British Journal of Nutrition*, 88, S19-S27.
- Lane, D. J. (1991). 16sS/23S rRNA sequencing. *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. E. Stackenbrandt and M. Goodfellow. Chichester, Uk, John Wiley & Sons: 115-147.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H. F., & Welling, G. W. (1995). Quantitative fluorescent in situ hybridisation of *Bifidobacterium* spp. with genus specific 16S rRNA targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3069-3075.
- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 869-873.
- Lemberg, D. A., Ooi, C. Y., & Day, A. S. (2007). Probiotics in paediatric gastrointestinal diseases. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 43(5), 331-336.
- Lepage, P., Seksik, P., Sutren, M., de la Cochetiere, M. F., Jian, R., Marteau, P., & Dore, J. (2005). Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, 11(5), 473-480.
- Lilly, D. M., & Stillwel, R. (1965). Probiotics - growth-promoting factors produced by microorganisms *Science*, 147(3659), 747-&.
- Lo, P. R., Yu, R. C., Chou, C. C., & Huang, E. C. (2004). Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo[a]pyrene by a modified Ames test. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 249-257.
- Manojlovic, V., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2006). Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine. *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 163-171.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rodas, A. M., Urdiain, M., & Pardo, I. (2008a). *Lactobacillus bobalius* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), 2699-2703.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rosselló-Mora, R., & Pardo, I. (2008b). *Lactobacillus uvarum* sp. nov. - A new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(6-8), 425-433.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rosselló-Mora, R., & Pardo, I. (2009a). *Lactobacillus oeni* sp. nov., from wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2010-2014.

- Mañes-Lázaro, R., Song, J., Pardo, I., Cho, J. C., & Ferrer, S. (2009b). *Lactobacillus aquaticus* sp. nov., isolated from a Korean freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(9), 2215-2218.
- Martin-Pelaez, S., Gibson, G. R., Martin-Orue, S. M., Klinder, A., Rastall, R. A., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., & Costabile, A. (2008). In vitro fermentation of carbohydrates by porcine faecal inocula and their influence on *Salmonella typhimurium* growth in batch culture systems. *Fems Microbiology Ecology*, 66(3), 608-619.
- Matsuzaki, T., & Chin, J. (2000). Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology*, 78(1), 67-73.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.
- McCartney, A. L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88, S29-S37.
- McMaster, L. D., Kokott, S. A., Reid, S. J., & Abratt, V. (2005a). Use of traditional African fermented beverages as delivery vehicles for *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 231-237.
- McMaster, L. D., Kokott, S. A., & Slatter, P. (2005b). Micro-encapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21(5), 723-728.
- Midolo, P. D., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F., & Grayson, M. L. (1995). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4), 475-479.
- Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I. C., Nicholls, R. J., Gionchetti, P., Campieri, M., & Kamm, M. A. (2004). Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*, 53(1), 108-114.
- Montalto, M., Nucera, G., Santoro, L., Curigliano, V., Vastola, M., Covino, M., Cuoco, L., Manna, R., Gasbarrini, A., & Gasbarrini, G. (2005). Effect of exogenous beta-galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(4), 489-493.
- Monteoliva-Sánchez, M., Aguilera, M., Jiménez Pranteda, M. L., & Ramos-Cormenzana, A. (En prensa). Probióticos en las distintas etapas de la vida. In A. R. Cormenzana, M. M. Sánchez & M. E. N. Macías (Eds.), *Probióticos y Salud*. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Montesi, A., Garcia-Albiach, R., Pozuelo, M. J., Pintado, C., Goni, I., & Rotger, R. (2005). Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 281-289.
- Morillo Perez, J. A., Garcia-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., & Monteoliva-Sanchez, M. (2008). Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(11), 2699-2704.
- Morita, H., Shiratori, C., Murakami, M., Takami, H., Kato, Y., Endo, A., Nakajima, F., Takagi, M., Akita, H., Okada, S., & Masaoka, T. (2007). *Lactobacillus hayakitensis* sp. nov., isolated from intestines of healthy thoroughbreds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2836-2839.
- Morita, H., Shimazu, M., Shiono, H., Toh, H., Nakajima, F., Akita, H., Takagi, M., Takami, H., Murakami, M., Masaoka, T., Tanabe, S., & Hattori, M. (2010). *Lactobacillus equicursoris* sp. nov., isolated from the faeces of a thoroughbred racehorse. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 109-112.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), M20-M24.
- Nagafuchi, S., Takahashi, T., Yajima, T., Kuwata, T., Hirayama, K., & Itoh, K. (1999). Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(3), 474-479.
- Namba, K., Hatano, M., Yaeshima, T., Takase, M., & Suzuki, K. (2010). Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 administration on influenza infection, influenza vaccine antibody titer, and cell-mediated immunity in the elderly. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 74(5), 939-945.
- Nguyen, T. D. T., Kang, J. H., & Lee, M. S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 358-361.
- Nicolaus, B., Moriello, V. S., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., & Gambacorta, A. (2003). Bacilli from shallow mediterranean marine vents producers of exopolysaccharides *Recent Research Developments in Microbiology, Vol 7, Pt 1* (Vol. 7, pp. 197-208). Trivandrum: Research Signpost.
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145-1158.
- Nielsen, D. S., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Holzapfel, W. H., & Jakobsen, M. (2007). *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1468-1472.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A., & de los Reyes-Gavilan, C. G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 79-86.
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., & Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1059-1066.
- Ogata, T., Kingaku, M., Yaeshima, T., Teraguchi, S., Fukuwatari, Y., Ishibashi, N., Hayasawa, H., Fujisawa, T., & Iino, H. (1999). Effect of *Bifidobacterium longum* BB536 yogurt administration on the intestinal environment of healthy adults. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1), 41-46.
- Ogier, J. C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J. Y., & Delacroix-Buchet, A. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5628-5643.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., & Bach, J. F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: An update. *Clinical and Experimental Immunology*, 160(1), 1-9.
- Okutani, K. (1984). Antitumor and immunostimulant activities of polysaccharide produced by a marine bacterium of the genus *Vibrio*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50(6), 1035-1037.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Stability of microencapsulated *Bifidobacterium lactis* (BI 01) and *Lactobacillus acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24, 685-693.
- Ouweland, A. C., & Salminen, S. J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8(9), 749-758.

- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1-4), 279-289.
- Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4-8.
- Parra, M. D., de Morentin, B. E. M., Cobo, J. M., Mateos, A., & Martinez, J. A. (2004). Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 60(2), 85-91.
- Pascual, L. M., Daniele, M. B., Ruiz, F., Giordano, W., Pájaro, C., & Barberis, L. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *Journal of General and Applied Microbiology*, 54(3), 141-148.
- Poncelet, D., Babak, V. G., Neufeld, R. J., Goosen, M. F. A., & Burgarski, B. (1999). Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of microgel beads containing biocatalyst. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79(2-3), 213-228.
- Pridmore, R. D., Pittet, A. C., Praplan, F., & Cavadini, C. (2008). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. *Fems Microbiology Letters*, 283(2), 210-215.
- Ramos-Cormenzana, A., Fuentes, S., Ferrer-Cebrian, R., & Monteoliva-Sanchez, M. (2005). Probiotics and biotherapy. *Recent Research Developments in Microbiology*, Vol 9, Pt 1, 9, 97-127.
- Ramos-Cormenzana, A. (2008). Nutracéuticos y Cáncer. *XIII Congreso Internacional de la Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos, Tegucigalpa (Honduras)*.
- Ramos Cormenzana, A. (2009). La modificación de la respuesta inmune por los antimicrobianos. *Ann. Real Academia de Farmacia de Cataluña*, 3-32.
- Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C., & Bruce, A. W. (2001). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 32(1), 37-41.
- Reid, G., & Burton, J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4(3), 319-324.
- Reid, G., & Bruce, A. W. (2003). Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgraduate Medical Journal*, 79(934), 428-432.
- Reid, G., Charbonneau, D., Erb, J., Kochanowski, B., Beuerman, D., Poehner, R., & Bruce, A. W. (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L-fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 35(2), 131-134.
- Roberfroid, M. B. (1998). Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *British Journal of Nutrition*, 80(4), S197-S202.
- Rodd, A. B., Dunstan, D. E., & Boger, D. V. (2000). Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 42(2), 159-174.
- Rokka, S., & Rantamaki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1), 1-12.
- Rosalam, S., & England, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 197-207.
- Rouse, S., Canchaya, C., & van Sinderen, D. (2008). *Lactobacillus hordei* sp. nov., a bacteriocinogenic strain isolated from malted barley. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2013-2017.
- Ruiz-Bravo, A., Jimenez-Valera, M., Moreno, E., Guerra, V., & Ramos-Cormenzana, A. (2001). Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(4), 706-710.

- Saavedra, J. M. (2007). Use of probiotics in pediatrics: Rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice*, 22, 351-365.
- Salminen, S. (1996). Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutrition Newsletter*, 5, 16-18.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. K. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 107-110.
- Salzman, N. H., de Jong, H., Paterson, Y., Harmsen, H. J. M., Welling, G. W., & Bos, N. A. (2002). Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology-Sgm*, 148, 3651-3660.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17(11), 1284-1289.
- Saulnier, D. M., Kolida, S., & Gibson, G. R. (2009). Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Current Pharmaceutical Design*, 15(13), 1403-1414.
- Saulnier, D. M. A., Gibson, G. R., & Kolida, S. (2008). In vitro effects of selected synbiotics on the human faecal microbiota composition. *Fems Microbiology Ecology*, 66(3), 516-527.
- Saulnier, D. M. A., Spinler, J. K., Gibson, G. R., & Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 135-141.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., & Black, R. E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infectious Diseases*, 6(6), 374-382.
- Schaafsma, G. (1996). State-of-the-art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition Newsletter*, 5, 23-24.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L., & Vancanneyt, M. (2007). *Lactobacillus crustorum* sp. nov., isolated from two traditional Belgian wheat sourdoughs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1461-1467.
- Sgouras, D. N., Panayotopoulou, E. G., Martinez-Gonzalez, B., Petraki, K., Michopoulos, S., & Mentis, A. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(12), 1378-1386.
- Sharpe, M. E., Fryer, T.F., Smith, D.G. (1966). *Identification of the Lactic Acid Bacteria. Identification Method for Microbiologists Part A*. London and New York: Academic Press.
- Sheih, Y. H., Chiang, B. L., Wang, L. H., Liao, C. K., & Gill, H. S. (2001). Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(2), 149-156.
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 58(3), 557-561.
- Sivaroban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.

- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene and household size. *British Medical Journal*, 299(6710), 1259-1260.
- Sun, W. R., & Griffiths, M. W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61(1), 17-25.
- Sutherland, I. W. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides* (Vol. 9): Cambridge Studies in Biotechnology.
- Sutherland, I. W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 12(2), 393-448.
- Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16(1), 41-46.
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2530-2535.
- Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Thawai, C., Yukphan, P., & Okada, S. (2007). Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *Journal of General and Applied Microbiology*, 53(1), 7-15.
- Tannock, G. W. (2002). Probiotics and Prebiotics: Where are we going? In G. W. Tannock (Ed.), *Probiotics and Prebiotics: Where are we going?* (pp. 1-40). Norfolk, England: Caister Academic Press.
- Tavan, E., Cayuela, C., Antoine, J. M., & Cassand, P. (2002). Antimutagenic activities of various lactic acid bacteria against food mutagens: heterocyclic amines. *Journal of Dairy Research*, 69(2), 335-341.
- Tennyson, C. A., & Friedman, G. (2008). Microecology, obesity, and probiotics. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 15(5), 422-427.
- Teratsubo, M., Tanaka, Y., & Saeki, S. (2002). Measurement of stress and strain during tensile testing of gellan gum gels: effect of deformation speed. *Carbohydrate Polymers*, 47(1), 1-5.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Tuohy, K. M., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A. L., & Gibson, G. R. (2007). Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1026-1032.
- van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H., & Lens, P. N. L. (2003). Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2(1), 9-33.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.
- Vann, W. F., Schmidt, M. A., Jann, B., & Jann, K. (1981). The structure of the capsular polysaccharide (k5 antigen) of urinary-tract-infective *Escherichia coli* O10-k5-h4 - a polymer similar to desulfo-heparin. *European Journal of Biochemistry*, 116(2), 359-364.
- Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics--From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.
- Vela, A. I., Fernandez, A., Espinosa de los Monteros, A., Goyache, J., Herraiz, P., Tames, B., Cruz, F., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2008). *Lactobacillus ceti* sp.

- nov., isolated from beaked whales (*Ziphius cavirostris*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 891-894.
- Vergin, F. (1954). Anti- und Probiotika. *Hippokrates*, 25(4), 116-119.
- Walker, A. W., Duncan, S. H., Leitch, E. C. M., Child, M. W., & Flint, H. J. (2005). pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3692-3700.
- Wang, K. Y., Li, S. N., Liu, C. S., Perng, D. S., Su, Y. C., Wu, D. C., Jan, C. M., Lai, C. H., Wang, T. N., & Wang, W. M. (2004). Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 737-741.
- Wang, L. T., Kuo, H. P., Wu, Y. C., Tai, C. J., & Lee, F. L. (2009). *Lactobacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2064-2068.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Tomii, Y., Sasamoto, M., Makino, H., Kudo, Y., & Okada, S. (2009). *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 754-760.
- Weichselbaum, E. (2009). Probiotics and health: A review of the evidence. *Nutrition Bulletin*, 34(4), 340-373.
- Weinbreck, F., Bodnar, I., & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 364-367.
- Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Togashi, H., Enomoto, K., & Enomoto, T. (2006a). Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BBS36 in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(2), 86-93.
- Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Miyaji, K., Iwatsuki, K., Togashi, H., Enomoto, K., & Enomoto, T. (2006b). Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clinical and Experimental Allergy*, 36(11), 1425-1435.
- Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Miyaji, K., Enomoto, K., Sakoda, T., Iwatsuki, K., & Enomoto, T. (2007). Clinical efficacy of probiotic *Bifidobacterium longum* for the treatment of symptoms of Japanese cedar pollen allergy in subjects evaluated in an environmental exposure unit. *Allergology International*, 56(1), 67-75.
- Zalan, Z., Nemeth, E., Barath, A., & Halasz, A. (2005). Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3), 219-225.
- Zoetendal, E. G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L., & de Vos, W. M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3401-3407.

ANEXO

SECUENCIA DEL GEN 16S r RNA DE LA CEPA PROBIÓTICA

L. plantarum CRL 1815

CAGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTG
 CTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACCTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGC
 GGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAG
 ATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCAT
 GGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTA
 CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
 AGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACGTTCAGGTATTGACG
 GTATTTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
 CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACC
 GAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTC
 GAAAGTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATAACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGT
 GGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
 CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCG
 AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGAT
 ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACC
 CTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGA
 GTTGCGAACCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGC
 CTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCC
 GCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGTGTTACC
 C

SECUENCIAS DE LAS BANDAS MAYORITARIAS PRODUCTO DE LA ESCISIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA.

HX1

AAACGAAAAACCCTTTCCCGGCTTTACACATCCATGACCAACCAAAAAGAGAAGCTTTTCTTCTGGACCG
GGGAGACACGGACGCATGGTTCTTGTCTCATCCATCTTGAGATGTTGGGTAAAGTCTCGCAAAGAGCGCA
ACCCTTAACCCAGGCACCAGCACGTAAAGATGGGCACCTCTAAAGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTAC
AAAGAGAAGCCAACCCGTGAAGGCAAGCAAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATTGTAGTCTGCAA
CTCGCCTACACGAGAGGGCT

HX2

GAAGAACCCTTACCAGTCCTTGACATCCTGCTGACGTATCAGTAACGTGATATTTCCCTACGGGACAGCAGA
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCCTGTCTCAGTAGCCAGCAGTTAGGCTGGGCACCTCTGAGGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAGGAAG
CGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTCCACAAA
GTGAAGCGAACCTGTGAAGGGGAGCAAATCCAGAAAAGACGTCCCTAGTTTCA

HX3

ACGCGAAGAACCCTTACCTGATCTTGACATCCCCCTGACCGGCCCGTAATGGGGCTTTCCCTTCGGGGCAG
GGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCCTTATCTTAGTAGCCAGCAGTAAGATGGGAACCTCTAGGGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAAC
AAAGGGAGCGGAGACCGCGAGGTAGAGCAAATCCCTAAAAATAACGTCT

HX4

AACGCGAAGAACCCTTACCTAAGCTTGACATCCTTTTGACCGATGCCCTAATCGCATCTTTCCCTTCGGGGA
CAGAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCCTTGCTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACCTCTAGAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGG
TACAGAGGGCAGCCAAGTCTGAGGCGGAGCTAATCCCTTAAAGCCTATTCTCGAGTTTTTCC

HX5

CACGGGGGAACGCGAAGAACCCTTACCAAGCCTTGACATCCCCCTGACAGGACAGTAACGCCTCCTTTTC
TTCGGAACAGGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTTACCTTCACTAGCCAGCACGTAAAGGTGGGCACCTCTGGAGGGACTGCCAGGGA
CAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGCGTAAACAAAAGGAAGCAGCCCTGTGAAGGTGAGCAAACCCCAAAAATAACGTCCAGTTCCGGAT
TGTAAGTGGTG

HX6

AGCTCTTGACATCTGGATGACGAATCCGTAACGGGATTTTCTCTTTCGGACCATCCAAAACAGGTGGTGC
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCTTTAGT
AGCCAGCAAGTAAAGTTGGGCACCTCTAGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAGAGGGAAGCGAGCC
TGCGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCCGGATTGTAGTCTGCAACCCGACTACATGAAG
CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAAAAATGCCGCGGTGAATACGTTCGCCGGTCTGTAACACCCCGAA

HX7

GATCTTGACATCCTCCTGAATGCAGGGCAAAGCCTGCAGGCCCTTCGGGACAGGAGAGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCTTTAGTA
GCCAGCAGGTGAAGCTGGGCACCTCTAGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGGGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAGAGGGAAGCGAGCCT
GCGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCCGGATTGTAGTCTGCAACCCGACTACATGAAG
TGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAAAAATGCCGCGGTGAATACCTTTCCCGGGTCTTTAAACCCCGGAA

HX8

ATGTGCGCTTGAATAGTAGGGAACAACATGTGAAAGCATGCGACTCTTCGGAGGCGTTACACAGGTGCTG
 CATGGCCGTCCTCCGCTCGTGTGAGATGTTTGGTTAAATCCCCAACGAGCGCAACCCCTGTTGCCA
 GTTACCAACACGTGAAGGTGGGGACTCTGGCGAGACTGCCAGATCAACTGGGAGGAAGGTGGGGACCAC
 GTCTGGTCAGTATGGCCCTTATGCCCGGGGCTGCACACGTACTACAATGCCAGTACAGAGGGGGCCAA
 GCCGCGAGGCGGAGGAAATCCTAAAAACTGGGCCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACCCGCCTACACGAA
 GCCGGAATCGCTAGTAATGGCGCATCTCCTACGGCCCCGTGAATACCTTCCCGGTCTTGGGACA

HX9

GAACCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTAATGAACAACATGTGAAAGCATGCGACTCTTCGGAGG
 CGTTACACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGTCTGTGAGATGTTTGGTTAAGTCCAGCAACGAGC
 GCAACCCCTGTTGCCAGTTACCAGCACGTGAAGGTGGGGACTCTGGCGAGACTGCCAGATCAACTGGGA
 GGAAGGTGGGGACGACGTGAGTTCAGTATGGCCCTTATGCCAGGGCTGCACACGTACTACAATGCCAG
 TACAGAGGGGGCCGAAGCCGCGAGGCGGAGGAAATCCTAAAAACTGGGCTCC

HJ1

AACGGGAAGAACCTTCCAGTCCTTGACATCCTCCTGACGTATCAGTAAGGTTATATTTCTTTCGGGACA
 GCAAAGACAGTTGGTGCATGTTGTCAGTTCAGTTCGGAGAGTTTGGTTTAAAGTCCAGCTCCGAGG
 CCAACCCGATTCCTTAGAAGCAGGCAGTTAAGATGGGCACCTTAAGGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTGGGCTACACCCGTGCTACAATGGCGTCC
 TACCAAAAAAGA

HJ2

AACGGGAAAAACCTTACCAGTCCTTGCCATCCTCCGGACGTATCAGTAACGGGATATTTCTTTCGGGACA
 GCAGAAACAGGGGGGAGGGTTTGGTTCAGTTCGGGTCGGGAAATTTTGGTTAAGTCCGCAACGAGG
 CCAACCCCTTTCCTCAGTAGCCAGCAGTTAGGATGGGCACCTCTGAGGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAG
 GAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGGCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAC
 ACAAAGGGAAGCGAACCCGCGAAGGGGAGCAAATCCAGAAAAGACGTCCAGTTCGGATTGTAGTCTGC
 AACTCGATTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGATTTCC

HJ3**Banda 1**

AACCGGAAGAACCTTACCAGTCCTTGACATCCTGCTGACGTATCAGTAACGTGATATTTCTTACGGGACA
 GCAAAGCCAGGTGGTGCATGGTTCGTGAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCAGCAACGAGC
 GCAACCCCTGTCCTCAGTAGCCAGCAGTTAGGCTGGGCACCTCTGAGGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAG
 GAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTCC
 ACAAAGTGAAGCGAACCTTGCGAAGGGGAGCAAATCCAGAAAAGCCGTCCCTAGGTTTTCG

Banda 2

ACGGGGGGAACGGGAAGACCCTTACCAGTCCTTGACATCCTGTGGACGTATCAGTAACGTGATATTTCTT
 ACGGGACAGCAGAGACAGGTGGTGCATGGTGGTGGTTCAGTTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCCCAACCCCTGTCCTCAGTACCCAGCAGTTAGGTTGGGCACCTCTGAGGAGACTGCCGGGGACA
 ACCCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAA
 TGGCGTCCACAAAGTGAAGCGAACCTGTGAAGGGGAGCAAATCATAGAAAAGTCTGTCCCT

Banda 3

GAACCGAAGAACCTTACCTGATCTTGACATCCCCCTGACCGGCCCGTAATGGGGCTTTCCCTTTCGGGGC
 AGGGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCCTTATCCTTAGTAGCCAGCAGTAAGATGGGAACCTTAGGGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAA
 ACAAAGGGAGGCGAGACCGCGAGGTAGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGC
 AACTCGACTTCGCGAAGCGGGAATCCGCCTTT

Banda 4

AACCGGAAGAACCTTACCTGATCTTGACATCCCCCTGACCGGCCCGTAATGGGGCTTTCCCTTTCGGGGCA
 GGGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCCCTTATCCTTAGTAGCCAGCAGTAAGATGGGAACCTTAGGGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGG
 AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAA
 CAAAGGGAGGCGAGACCGCGAGGTAGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCA
 ACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATGC

HJ4**Banda 1**

AACGCGAAGAACCTTACCTGATCTTGACATCCCCCTGACCGGCCCGTAATGGGGCTTTCCCTTCGGGGCA
GGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
GCAACCCTTATCTTAGTAGCCAGCAGTAAGATGGGAACTCTAGGGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAA
CAAAGGGAGGCGAGACCGCGAGGTAGAGCAAACCCTAAAAATAACGTCTTCG

Banda 2

TGATCTTGGACATATCCCCTCTACGGGCCCGGATAGGGGCTTTCCCTTCGGGGCAGGGGAGACAGGGGG
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCT
TAGTAGCCAGCAGTAAGATGGGAACTCTAGGGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAGGCGAG
ACCGCGAGGTAGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCTCAGTTCCGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAAAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACCACACCGA

HJ5

GGCGCTGGACATATCGGGTTGACGGAACCCCGAAGGGATTTTTTCTTCGGAACAGCAGAGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTA
GTAGCCGGCGGTTAGGGGGGGGCCCTCTGGAAAACCGGCCGGGAAAACCCCGGAGAAAAGGGGGGAATAAC
TCCAAAATCTTCTGGCCCTTATGACTGGGGCTCCCCCTTGCTACATGGGCGGAAAAAAGGGAAGCAAC
CCTGGAAGGGGAACAAAACCCAAAAAATCTCTCCCATTTGGAATTGAATCCGGCACTCCACTTCCTTAA
AGTTGGATTCTTATAATTCGGAATCAAATGTCGCCGGTAAATCCTTCCCGGGTGGACACCCCGAA
A

HJ6

GTAATATGGTAGCTAGTAGAACACCCACAGGGATTTTTTCTTCGGAACAAGAGAGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTCAGTAG
CCAGCAGTAAGGCTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGGGGGATGACGTCA
AATCATCTTCCCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCAACCCTG
GGAGGGGAAGCAAACCCAAAAAACCCTCCCATTTCCGATTGTACTCTGCAACCCGACTACATGAAGCT
GGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAAAATGTTGCGGTGAATACCTTCCCGGGTCTGGAAAACCCCGGAA

HJ7**Banda 1**

AACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATCCTTCTGACCGTCCCCTAACGGGGATTTTTTCTTCGGGGCA
GGAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
GCAACCCTTATCTTCAGTAGCCAGCAGGTAAGCTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCGGGGACAACCCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGGAAGCGACCCTGTGAAAGGCGAGCAAACCCCAAAAAAACCCTCCAGTTCCGATTGTAGTCTG
CAACTCGACTACACGAAGGGGGAATCGCTAGTAATGCGCGAATCA

Banda 2

GAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCCTGTGACCATCCCCTAACGGGGATTTTTCTTCGGGGC
AAGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTTGTGTTGTGAGAAGTTGGGTTAAATTCGCAAAGAA
GGCCAACCCTATTTTCAGTAGCCAGCAGGCAAGGCTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGG
AGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGTTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG
AAACAAAGGGGAAGCGAACCTGCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAAAGCCGTCCAGTTCCGATTGTAGTCT
GCAACTCGACGTACACGAAGGGGGACTCGCGAGTAATGCGCAGATACAG

Banda 3

AACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATCCTTCTGACCGTCCCCTAACGGGGATTTTTCTTTGGGGCA
GGAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
GCAACCCTTATCTTCAGTAGCCAGCAGGTAAGGCTGGGCACTCTGGACAGACTGCCGGGGATAACCCGGA
GGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGT
AACAAAGGGGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGAACCCCAAAAAAGCCGTCCAGTTCCGATTGCAGTCTG
CAACTCGAGTCTGCGTGGGGGAGCCCGGGTAGTCCGGAATCACATTTGAT

HJ8**Banda 1**

AACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATCCCCCTGACAGGACAGTAACGCGTCCCCTCCCTTCGGAACA
GGGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
GCAACCCTTACCTTACAGTAGCCAGCAAGTAAAGTGGGCACTCTGGAGGGACTGCCAGGGACAACCTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGAAGCAACCCTGTGAAGGTGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGATTGTAGTTGT
G

Banda 2

TGTGCTTGGTATATGGGGCTAGGGAAACCCCGGAGGGATTTTCTCTTCGGAGCATCCGAGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTGAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTA
GTAGCCAGCAAGTAAAGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGGGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAGAGGGAAGCGAG
CCTGCGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACCCGACTACATGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAAATGCCGCGGTGAATACGTTCGCGGTCTGAACACCCCGA

HJ9

AACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTAATGAACAACATGTGAAAGCATGCGACTCTTCGGAGGC
GTTACACAGGTGCTGCATGGCCGTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTTGGTTAAGTCCAGCAACGAGCG
CAACCCTGTTGCCAGTTACCAGCACGTGAAGTGGGCACTCTGGCGAGACTGCCAGATCAACTGGGAG
GAAGGTGGGGACGACGTGAGTCAATGAGTGGCCCTTATGCCAGGGCTGCACACGTACTACAATGCCAGT
ACAGAGGGGGCCGAAGCCGCGAGGCGGAGGAAATCCTAAAAACTGGGCCAGTTCGGACTGTAGGCTGCA
ACCCGCTACACGAAGCCGGAATCGCTAGTAATGGCGCATCACGT

OX1

TGGACATCCTTTTATACGCTCTAGAAATAAAGTTTTTCCCTTCGGGGACAAAGAGACAGGGGGTGGCTG
GTTGTCTCCTCTCGTGTGAGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCCCCCTTATTTCTAGTTG
CCATCTTTAAGTTGGGCCCTCTAGGTTGACTGCCGGGGACAACCCGGAGGAAGGGGGGGATAACGTCAA
TCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGATAAAAACAAAGGGAACCAAACCCGCA
AGGTCAAGCAAACCCCAAAAAAATATTTCTCATTTGCAATTGTACTCTGCACCTCGACTACATGAAGCTGG
AATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCGCGGCCGAAAACCTCCGATCATTTTT

OX2

AATACATTGACATCCTTTTAAACGTATCAGTAACGTGATTTTTTCTACGGGACGGCAAAGACAGGGGGTGC
ATGGTTGTCTCCAGCTCTTGTGCGGAGATGTTGGGTTAAATCCCGCACCAGCGCACCCCTTGTCTCAG
TATCCGCCGATTAGAGTGGGGCCTCTAGAAGACTGGCGGGGAAACCCGGAAGAAGGGGGGGAAAACCT
TCAAATCTTCTGCCCTTTAGGGGTGGGGTTACCCCTGGTTCAATGGGGTCCAAAAAGGAAACCAAAC
TGGCAAGGGCAGCAAACCCCAAAAAAATGTTCCCTTCGGGATTGATTCGCAACTCCCTTACATGAAAC
TTGAAACCGTTTTTAAACCCGAATCTCAAAGTGCCCCGAAAACCTTTCCCGGTGGGACCCCCCGAAA

OX3

ATCCTTGACATCCTGCTGACGTATCAGTAACGTGATTTTTTCTACGGGACAGCAAAGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCTCCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCAGTA
GCCAGCAATTAGGCTGGGCCCTCTGAGGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAGGAAGGGGGGGACGACCTCA
AATCATCATGCCCTTATGGGCTGGGCTACCCCGTGTCTACAATGGCGTCCACAAAGTGAACGAACCTG
TGAAGGGGAGCAAACCCCAAAAAAATGTTCCAGTTCGGATTGTAATCTGCAACTCGATTACATGAAGCT
GGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAAATGTTGCGGTGAATACGTTCGCGGTCTTGTACCCCCCGAAA

OX4

CTCCGTTGTACATATCTGCTCGACGTATCCGTAACAGTGAATTTTTCTACGGGACAGCAAAGACAGGTGG
TGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTC
CAGTAGCCAGCAATTAGGCTGGGCACTCTGAGGAAACTGCCGGGGAAAACCCGGAGGAAGGGGGGGACAA
CCTCAAATCATCATGCCCTTATGGGCTGGGCTACCCCGTGTCTACAATGGCGTCCACAAAGTGAACGA
ACCTGTGAAGGGGAGCAAACCCCAAAAAAATGTTCCAGTTCGGATTGTAATCTGCAACTCCATTACATG
AAGCTGGAATCCCTAGTAATCCCAAATCAAATGTTGCGGTGAATACGTTCGCGGTCTTGTACCCCCCG

OX5**Banda 1**

AAGTCTTGACATCCTTTTGACCGATGCCTAATCGCATCTTTCCCTTCGGGGACAGAAGTGACAGGGGGTG
 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCCTTTA
 GTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGGGGGATGACGT
 CAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAGAGGGCACCCAATT
 CGTGAGGCGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCTACATGAAG
 CTGGAGTTACTAGTAATCGCAAATCAAAATGCTGCGGTGAATGCGTTCGCCGGTTCACCCCCCGAAA

Banda 2

TAGTCTTGACATCCTTTTGACCGATGCCTAATCGCATCTTTCCCTTCGGGGACAGAAGTGACAGGGGGTG
 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCCTTTA
 GTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTATAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACTT
 CAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACACAGGGCAGCCAATT
 CGTGAGGCGGAGCTAATCCCTTAAAGCCTTTCTCAGTTCGGATTGAAGGCTGAAACTCCCTTACATGAAG
 CTGGAGTTACTAGTAATCGCAAATCAAAATGCTGCGGTGAATGCGTTCGCCGGTTCACCCCCCGAAA
 A

OX6

AGATCCTTGACATCCTCTTACACGCCCTAGAAATAGGGTTTCCCTTCGGGGCAAATGACAAGGGGGGCA
 TGGTTGTCTTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTAATTTTATT
 TGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTATACTGACTGCCGGGGACAAACCGAGGAAGGGGGGACGACGTCA
 AATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGGTTACAAAGGGCAGCGACCC
 CGCGAGGCCAAACGAATCCCATAAAACCTGTTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG
 CTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCACCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGAGACACACCGATT

OX7**Banda 1**

AAGGTCTTGACATCCTTGTGACCGATGCCTAATCGCATCTTTCCCTTCGGGGACAGAAGGACAGGGGGT
 GCATGGTTGTCTCCGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCACCTTGCCCTTTAGTTGCCAGCA
 TTAAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGGGGGATGACGTCAAATCATCA
 TGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAGAGGGCAGCCAAGTCTGAGGCGG
 AGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCCCTTACATGAAGCTGGAGTTAC
 TAGTAATCGCAAATCAAAATGCTGCGGTGAATGCTTTCGCCGGTCTTGAAAACCCAGAAA

Banda 2

GGATCCTTTTAGAAAAATCCCGCGCCACGGAAAACACAAAACGGAATCTTTCTTTTCGGGACAGCAAAAAA
 GGTGGTGCATGGTTTTCTTCAGCTCTGTGCGGAGATGTTGGGTTAATCCCCACCGAGCGCACCCCTTA
 TTTTTTTTATCCAGCGTTTTGGGTGGGCCCCCTGGAGAGACTGCCCGGACAACCCGGAAGAAGGGGGG
 ATGACCTCAAATCTTCTGCCCCCTTATGGCTTGGGCTACCCCGTGTACAATGGGTAAAAAAGGGAA
 GCGACCCCCCGAGGGGGAGCAAACCCAAAAAACAATCCCCGTTCCGGATTGTATTCTGCAACTCCACTA
 CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCCCAAATCAAAATGTCGCCGTGAATACCTTCCCGGGTCTTGTACAC
 CCGAA

OX8

GATCGCGCATAGTCTTGACATCCCCGAGATGTCTCTAGAAATAGAGAGTTTCCCTTCGGGAAAAAGGATAC
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTTTGTGTTGGGATAAGTCCCAGCAACGAGCGCCCCCT
 GTCGTTATTTGATGATTTGACGTGGGGACACCTTCCCTCAATGTTGTCAATAAACTGGACGATAGAGGGCA
 CAACTTAATGCTGGCAACTAACTTAAGGGGTGGCCTACACATGTGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA
 CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATTGTCCCCTAAGGAACTCTCTATCTCTTACACAT
 CAATGGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGAATCCCCCGTCCCCCTTCCCGGGTCTTGGACCCC
 CCGAGAGA

OX9**Banda 1**

ACCCCTCGTTGTCATCACCGAGACTTTTCGGAAATGGCATGTTCCCTTCGGGACCCGTGAGACAGGTGGTG
 CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATCTTTT
 GTTGCCAGCGGTCTGGCCGGGGACTTCTAGGAGACTTGCCGGGAAAAACCGGAAGAAGGGGGGGAAGAAC
 TCCAATCCTCCTGGCCCTTTATAACTTGGGTACCCCCCTTGTAAATTTGGGGAAACAAAAAGAAACCACC

TCTGAAAGGAAACCAACCCCAAAAAATGCCTCCCCATTTGGATTGGATCCTCCACCCCAATTCCTTAAGC
TGAATCCCAATTATTGGGGATCCAAATGCCCCGTTAAACCTTTCCCGGTTTGAACCCCGAAAACA

Banda 2

ACGCCTCTTGTTCATATCCCGTCTAAGGGAAAGTAACGTTTCGTTTTCTTCGGGAGAGGGGAGACAGGTGG
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTTT
CAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGACTCTGGGGAGACTGCCCGGAAAACCGGGAGGAAGGGGGGGATGA
CCTCAAATCATCCTGCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGTAACAAAGGGAAGCGG
CCCCGCGAGGGTGAACAAACCCCAAAAAAGCTGTCCAGTTTCGGATTGTAGTCTGCAACCCGACTACATG
AAGCCGGAATCCCTAGTAATCCCAAAATCAAAATGTTGCGGTGAATACCTTCCCGGGTCTTGGACCCACCG
AAA

OX10

AATGGGGTTGGTATATCCGACTAAAGGACGGCGAACCTCCTTTTTCTTCGGAATTGGGTGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTACCTTCAG
TAGCCAGCATGTTATGGTGGGCACTCTGGAGGGACTGCCAGGGACAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCACCC
CTGTGAAGGTGAGCAAAACCCCAAAAAAAGCTGCCAGTTTCGGATTGTAGTCTGCAACCCGACTACATGAA
GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACCTTCCCGGGTCTTGTACACACCGA

OX11

TGCTCTTGTACATCCTCTCTCGACGGCCCGTAATGCGGCTTTTTCTTCGGGACAGAAGAGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAATTTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCCTGC
AGTAGCCGGCGATTAAAGCCGGGCACTCTGTAGGGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGGGGGGACGA
CCTCAAATCATCGTGCCCTTATGGGGGGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCCAACATAGGGAGGCAA
ACCTGGAAGGGGAACCAAAACCCCAAAAAAGGCGTCCAGTTTCGGATTACAGCCTGCAACCCGGCTGTATG
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCCAATGCTGCGGTGAATACCTTCCCGGGTCTGAACCCCGCCGA
AG

OX12

CGCCCGTTGTACATCCCTCTCGACGGCCCGTAATACGGACTTTTTCTTCGGGACAGAAGAGACAGGTG
GGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAATTTCCCGCACCGGGGGCACCCCTTGCTT
TTAGTACCCGATGATTTGACGTGGGCCCTCTTCTCCTGCTTGGGATAAGCCGGAGGAAGGGGGGGCC
CACCTCAAATCGTTGGGCCCTTTATGGATGGGGTGCCTCCCTTGCTACAATGGCCCAACATATCGAAAC
AAGCCCTGAAGAGAAAACATGACCCCAAAGACTCCGTCCCCCTAAGATTGTACCCTGCTACCCGACTACA
TGAAGCTGGAATCGCTTTGAATCGGTTCTTCGAATTTCCCGGGGAATCCCTCCCGGGTCTTGTAAACCC
CCGGAGCGA

OX13

CTGCCGCTTGGACATATCCGGTCTCGGCACGCCGGACCTGCTTCCCTTCGGGGGGGGTGGACAGGTGG
GGCATGGTTGTCGTCACCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAATTTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCC
CATTACCCACCAGGGAAGGTGGGGACCTCGGGGGGACTGGCCGGGACCACCCGGGAGGAGGGGGGGACCA
ACTTCAATCCTTCTGGCCCTTTTGGCCGGGGCTTCCCCGTTCTACAATGGCCCTGAAAAAGGGGGACCA
AGCCGCGAGGCGGAACAAACCCCAAAAAATGGGCCCTTTTTGAATTTGCGCCCTGCCCTCCGCTGCTA
AAACCGGAATCCCTAAAAATCGCGAATCAAACGGCCCGTGAATACCTTCCCGGGTCTTGAACACCCCG
GAA

OX14

GGCTCTTGACATCTTCGGACAACCCCTGGAGACAGGGCGTTCCCTTCGGGGACCGAATGACAGGTGGTGC
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGT
TGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCG
CGAGGTGTAGCAAATCCATAAAAACCATTTCTAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCC
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGATGCCACCCGAAATT

OX15

GGATCTTGACATCTTCGGACAACCCCTGGAGACAGGGCGTTCCCTTCGGGGACCGAATGACAGGTGGTGC
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGT
TGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCG

CGAGGTGTAGCAAATCCCATAAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCC
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGAACACACCGA

OX16

GGTGCTTGACATGTGCCGGATCGCCCCGAAACGGGGTTTCCCTTCGGGGCCGGTTTACAGGTGGTGCAT
GGTCGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCGCATGTT
GCCAGCGGGTGATGCCGGAACTCATGTGGGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AGATCATCATGCCCTTACGTCCAGGGCTTACAGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGCGATGCGACACG
GTGACGTGGGGCGGATCGCTGAAAAACCGGTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGG
CGGAGTCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAACGCCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTTGAAAAACCCGAAAA

OJ1

CACGGGGGAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCTTTTGACCGATGCCAATGGCATCTTTCC
CTTGGGGGACAGAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACCGA
CCGCAACGAGCGCACCCCTTGCCTTTAGTTCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTTAGAGGACTGCCAGGGC
TAAACGGGAGAAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGTACACACGTGCTACAA
TGGGTGGTACAAAAGGCGAGCCAAGTCGTGAGGCGGAGCTAACCCAAAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGT
AGTGCT

OJ2

AACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCTTTTGACCTCTCCTTAATCGGAGATTTCCCTTCGGGGA
CAGAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACCGA
GCGCAACCCCTTGCCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACCTTAGAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGG
TACAGAGGGCAGCCAAGTCGTGAGGCGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
AAACTCGCTACATGAAGCTGGAGTCACTAGTAATCGCAGATCAGAATTGGCTC

OJ3

AACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATCCCCCTGACAGGAGGGTAACGCCTCCCTTCCCTTCGGAACA
CCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCCTTACCTTTCAGTAGCCAGCATGTAAGGTGGGCACCTTGGAGGGACTGCCAGGGACAACCTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGAAGCAGCCCTGTGAAGGTGAGCAAACCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGATTGTAGTCTG
CAACAT

OJ4

AACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATCCCCCTGACAGGACAGTAACGCGTCCCTTTTCTTCGGGACA
GGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCCTTACCTTTCAGTAGCCAGCATGTAAGGTGGGCACCTTGGAGGGACTGCCAGGGACAACCTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGAAGCAGCCCTGTGAAGGTGAGCAAACCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGATTGTAGTCTG
CAACCCGACTAGCA

OJ5

AACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCCTTCGGGAAC
CGTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCAT
ACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGACCATAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA
ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAGCGTGATCAGAATGCCA

OJ6

AACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTAATGAACAACATGTGAAAGCATGCGACTCTTCGGAGGC
GTTACACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCAGCAACGAGCG
CAACCCCTGTTGCCAGTTACCAGCACGTGAAGGTGGGGACTCTGGCGAGACTGCCAGATCAACTGGGAG
GAAGGTGGGGACGACGTGAGTATGGCCCTTATGCCAGGGCTGCACACGTACTACAATGCCAGT
ACAGAGGGGGCCGAAGCCGCGAGGCGGAGGAAATCCTAAAAACTGGGCCCGTTCTGGACATGT

SECUENCIAS DE LAS BANDAS CORRESPONDIENTES AL PUTATIVO *L. plantarum* CRL 1815 ESCINDIDAS DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA.

L1HX

AACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCCCCTGACCAGAGAGTAAAGTCTCCATTCCTTCGGGACA
GGGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
GCAACCTTACCTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGGTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCAGGGATAACCTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGTTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGGAGCAAGCGTGTGATGGTAAGCAAATCCCTAAAAATAACGTCCCTCAGTTTTCT

L2HX

CGGCCCTCTTAGACATCCCCACAGACCGCCAGTAATAGGGGGCTTTCCTTCGGGACAGCAGAAACAGGT
GGTGCATGGTTGTCCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGCT
TACAGTAGCCAGCAGCAAGGCTGGGCACTCTGTAAGGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGGGGGAC
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCAACAAAGGGAGGC
AAACCTGCGAGGGGGAGCAAAAACAAAAAAGGCGTCCAGTTCCGATTACAGCTGCAACCCGGCTGTA
TGAAGCTGGAATCCCTAGTAATCCCAAATCAAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGGACACAC
CGAAAA

L3HX

AAACGGGAAAAACCTTACCAGTCCCTACCTTCCCCTGGACGGGGAGGTAACGTTCTTTTTCTTTGGGGAC
AGGGGAACCAGGGGGGGCATGGTGTGTTTTCAGTTGGGGTCTTGAATGTTGGGTTAATTCCCCCAACGAG
GCCAACCCCTTTTTTTCAGTACCCAGCAGTTAAGGTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGA
GGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGGAAGCGAACCCGCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAAAGCTGTCCCTAGTTCCGATTGTAGTCT
G

L4HX

AACCCGAAGAACCTTCCCAGGCCTTGCCATCCCCTGGACGGGGAGGTAACGCTCCTTTTTCTTTGGGGCC
AGGGGGACCAGGGGGGCCATGTTGTTGTTTTCAGTTGGGTTTTGAGAATTTTGGGTTAATTCCCCCAAGAGG
GCCAACCCCTTTCTTTTCGGTACCCACCAGTTAAGGTGGGCACTCTGGAGAGACTGCCAGGGATAACCCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGGAAGCGGCCCTTGCAGGGGTGAGCAAATCCCAAAAAAATGTCTCTAGTTCCGATT

L5HX

AACCCGAAGAACCTTACCAGTTTTGAACTTCCCTCTGAACGGGGAGTTAACGTTCCTTTTCTTTGGGGCC
AGGGGAGCCAGGGGTGCTGGTTGGTGTTCAGTTGTGTTTTGAGATTTTTGGTTTAGTTCCGCAACGAGG
GCCACCCCTTTTTTTAGTTACCAGCCATTTAAGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGGAAGCGAGCCCTGAGGGTGAGCAAATCCCTAAAAATAATGTCTCTAGTTTTCA

L6HX

AAAGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATTTCCCCTGAACGGGACGGGAAAGGCTGTTTTCTTTGGGACA
AGGGAAAACAGGTGGGGCAAGGTTGTTGTTAGCTTGTGTTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
GCAAACCTTATCCTCAGTAGCCAGCAAGTAAAGCTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCAGGGATAACCCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGGGGAAGCGAGCTGTGAGGGTGAGCAAATCCCAAAAAATACCGTCCCTCGAGTTTTTCG

L7HX

AGACTTCATTGACATCCCCCTGACGGCAGGGTAATGGCTTTTTTCTTTCGGGACAGGGGAGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTTTTTT
AGTAGCCAGCATGTAAAGGGGGGCACTCTGGAGGAACGGCCGGGAAAACCCGGGAGAAGGGGGGGATAA
CTTCAAATCTTCTTGCCTTTTATAGCTTGGGTTCCCCCTGCTACATGGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAC
CCGGGGAGGGGAACAAAAACCCAAAAATCCCTTCCCAGTTCCGATTGTATTTGCCCCCGCTACATGA
GCTGGATCCCTAGAATCCCAAATCAAATGCCCGGTGAATCCTTTCCGGTCTTGAACACCCAGAAACATTT
ATCTGATATCTATATATATATGTTGAGGTTTCGAGTAGGTATAATAATCTAATTT

L8HX

ACCCGAAAAACCCCTTCCCAGGTTTGACCTTCCCCTGGCCAGGGAGGTAAGGTTCCCTTTTCTTTGGGACCA
 GGGAAACCAGTGGGGCCTGGTTGTTGTTAAGTTGGGTTCTGAGAAGTTTGGTTTAAATTCGCAAAGAGGG
 CCAACCCTACTTTCAGTTACCAGCCAGTTAAGGTGGGCACCTCTGGAGAGACTGCCAGGGACAACCTGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAA
 ACAAAGGGGAAAGCGGCCCTGTGAGGGTGAGCGAAATCCCTAAAAAACCTGTCTCTAGTTTGG

L9HX

TTTTCAATAACCCGTACTACTCGTCTTTACCATGGACTGGATGGATCCACAGGAACCTTTTTCTTTGGGGA
 CAATAGACACGTGGTGCATGTGTTTCTCCCCCTCTCGTCTCGAGATGTTGGGTTAAATCTCCCAACACGC
 GCACCCCTCTTTTTTTTTGTCCCGCAAGTTGAGATGGGCCCCACAGGCCCGCGTGGGACAACCGGGG
 GGAGGGGGAGGCCCATATAACGTGGGGCCATAATGAAGGGGATCCCCATTGGCGAAATTTAAACTA
 ATAAATAATAAAATATTTGAAAATCTTTTTTTTCCCATGTCTCCTTTTTTTCCCAAAAAGAATACCTCT
 TTTTT

L10HX

AGGCTCTTCGACATCCCCCTGACGGCTCGGTAACGTTCCCTTTCCCTTCCGGGCATGGAGACAGGTGGGGC
 ATGGTTGTCTCACCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTTT
 TAGCCAGCATTTAAAGGGGGCCTCTTGAAAAACTGCCGGGAAACCCGGGAGGAAGGGGGGGAAGT
 CCAAATCTTCTGGCCCTTTATGATTGGGGTTACCCCGTGTAAATGGGGTGAAAAAAGGAAACCAACC
 CGGGGAGGGGAACAAAACCCAAAAAACCTTCCCATTCGGAATGTATCTGCCACCCCTAACATGAA
 CTGGGATTCCTATAATTCGCGATTCAAATGGCCCCGTAAATACTTCCCGGTTTGGTAACCCCCCGAA
 AA

L11HX

CGGGGCGCGTTGACATCCCCGTGAACGGCACAGCAATAGCGAGTTTTCTTCCGGGGCGAGAAGACAGGG
 GGGGCATGGTTGTCTTACCTCTTGTCTGAGATGTTGGGTTAATTCCCCCAACAGCGCAACCCCTTTTT
 TTTATTAGCCACCATTTAAGGTGGGGACCTTGGGAAGACTGCCCGGGAAACCCGGGAGAAGGGGGGGAA
 AAACCTCAAATCTTCTGGCCCTTTTGGCCTGGGGTTCCCCCTTGTAAAAATGGCCGTAAAAAAGGGAAC
 CAACCCGCGAGGGGGAAAAAACCCAAAAAATGCCCTCCCTTCCGAGTGTGTGCTGCCCCCCCCCCCTAC
 AAAAACTGATATCTATTTAAACCCCAACTAAAAAGTGCGCCGTGAATACCTTCCGGGTCTTGGAAACCAC
 CGAAAA

L1HJ

AACCGGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATCCCCATGACCGGCAGTAACGCCCTTTCTTCCGGGACA
 GGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGAGTCTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
 GCAACCCCTTACCTTTCAGTAGCCAGCACGTAAGGTGGGCACCTCTGGAGGGACTGCCAGGGACAACCTGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
 AACAAAGGGGAAGCAGCCCTGTGAAGGTGAGCAAATCCAAAAATAACGTCCAGTTCCGATTTAGTCTG
 CAACCCGACTACATGAAGCGGGAATCGTG

L2HJ

AACCGGAAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCTGCTGGCAGCCCGTAATGCGGGCCTTCCCTCGGGACA
 GCAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGAGTCTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
 GCAACCCCTGCCTGCAGTAGCCAGCGGTTTAGCCGGGCACCTCTGCAGGGACTGCCGGGGACAACCCGGAG
 GAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCCA
 ACAGAGTGAGGCGAACCTGTGAGGGGGAGCAACCCAAAAAAGGCGTCCAGTTCCGATTTAGCCAG

L3HJ

CAGCTTCTTTGACATACCCCAGACGGAAGGGTAATGCCCTTCTTTCCCTTCCGGGACAGAAGAGACAGGTGG
 TGCATGGTTGTCTGAGTCTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGT
 TAGTAGCCAGCAGGTAAGCGGGGCCCTCTGGGGAAACGGCGGGGGAAACCCGGGAGGAGGGGGGGAA
 ACCTCAAATCTTCTTGGCCCTTATGGCTGGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGAAAACAAGGGAGGCG
 ACCCGCGAGGGGACCAAACCCAAAAATACCGTCCAGTTCCGGATTTGACTTGGCCCCCGCCTACAT
 GAAGCTGGAATCGTATTAATCGCAAACCAAATGCCGCGTGAATTCCTTCCCGGTTTGA

L4HJ

CGCCCCCTTTTTACATCCCCCAAGACCGTCCCTTAACCGGGATTTCCCTTCGGGGCAGGAGAGACAGG
 TGGGGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTAT
 GTTCAGTAGCCAGCAGGTAAGGCTGGGCACCTCTGGACAGACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGG
 ATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTAACAAAGGGAA
 GCGACCCTGCGAAGGCAAGCGAACCCCAAAAAAGCCATCCCAGTTCGGATTGCAGTCTGAAACTCGAGTGT
 CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAAATGTTGCGGTGAATACTTTCCCGGGTCTTGTACAC
 ACCGAAA

L5HJ

AACCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATTCGGATGACGAATCCGTAAAGGGGGTTTTTCTTTGGGGCA
 AGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
 GCAACCCCTTATCTTTAGTAGCCAGCAAGTAAAGTTGGGCACCTCTAGAGAGACTGCCGGGGATAACCCGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
 AACAAAGGGAAAGCGAACCTGTGAGGGGGAGCAAATCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGATTGTAGTCTG
 CAACCCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGATGCC

L6HJ

CCGCTTCCCTTTTGACATTCCCCCAGACGAAACATTAACGCCCTGCTTTCCCTTCGGGACAAGGGAAACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGTAACGAGCGCAACCCCTTT
 TTTTATAGTAGCCAGCAGGTAAGCTGGGGACTCTGGAGAGATTGCCGGTTATAACTTGGAGAAGGGTGGG
 GATGACTTCAAATCTTCTTGCCCCCTTATGATTTGGCCTACCCACGTGTTAAATTTGGCGTAAACAGAGGGA
 AGGGACCTTTCGAGGGGAAGCAAACCCCAAAAAATACCCTCCCAGTTCGAATTGTAGTCTGCACCCCCACT
 CCTTGAAGCTGGATCCCTTATTATCCCCGAATCAAAGGCCCGGTAATACTTTCCCGGGCTTTGTACC
 CACGGAAAA

L7HJ

AACCGAAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCTGCTGGCAGCCCGTAATGCGGGCTTTCCCTTCGGGACA
 GCAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
 GCAACCCCTGCTGCAGTAGCCAGCGGTTTAGCCGGGCACCTCTGCAGGGACTGCCGGGGACAACCCGGAG
 GAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTCA
 ACAGAGTGAGGCGAACCTGTGAGGGGGAGCCAAATCCACTAAA

L8HJ

AGACCCCTCCCTGGCCTTGCCATCTAATGACCAACAAGCAAAGCTTCATTCCTTTCCGATCGGGGAAAC
 AGGTGACACATGGTTGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGTAAAGTCCAACAACGAGCGCAACCCC
 CAACCCAGTTACCAGCACGTAAGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCAGGGACAACCCGGAGGAAGGTG
 GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATCCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCTAAACAAAGGG
 AAGCGACCAGTGAGGCGGAGCAAATCCCAAAAAAACGTCCCAGTTCGGATTGCAGTCTGCACCCGCCTA
 CACGAAGCGGGAATCCCTGGTAATGCG

L9HJ

AACCGAAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCTGCTGGCAGCCCGTAATGCGGGCTTTCCCTTCGGGACA
 GCAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
 GCAACCCCTGCTGCAGTAGCCAGCGGTTTAGCCGGGCACCTCTGCAGGGACTGCCGGGGACAACCCGGAG
 GAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCCA
 ACAGAGTGAGGCGAACCTGTGAGGGGGAGCAGACCACAAAAAGGCGTCCCAGTTCGGATTACAGCCTGC
 AACCCGGCTGTACGAAGGGGGGAATCCCTAGTAATCGCAAATCACATTCCTC

L10X

AGGATCGTTGACATCCCCCTGACAACCCAGTAACGTTCCCTTTTCCCTTCGGGACAGGGGAGACAGGTGGTG
 CATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTTTTCA
 GTAGCCAGCATTTAAGGTGGGACTCTGGGGAGACTGGCCGGGAAAACCCGGAGGAAGGGGGGAAGACC
 TCAAATCATCCTGCCCCCTTATGGGCTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGCCGTAAAAAAGGGGAAGCGGAC
 CCGCGAGGGTGAACAAACCCCAAAAAACCGTCCCCTTCGGATTGGAGTCTGCCACCCACTACATGAA
 ACCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGAACCCCCGAA

L20X

ACGCAACTTCGACATCCCCCTGACAATATAAGTAACGCTCCTTTTCCCTTCGGGACAGGGGAGACAGGGGG
 GGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTTTT

TATTAGCCAGCATTTAAGGTGGGGCCTCCGGGAAGACTGCCCGGAAAACCCGGAGGAAGGGGGGGAAGA
 ACTCCAATCCTCCTGCCCTTTTATAGCTGGGCTACCCCTTCTACAATTGCCGTAATAAAGGAAACGA
 ACCCGCGAAGGGGAACAAACCCCAAAAATCTGTTCCCTTTTGAATGGAGTCTGCCACCCCTTACATG
 AAGCCGGGATCCCTTATAATCCCAATCAAAATGGTGCAGTAAATCCTTCCCGGTTCTGGAAACCCCG
 GAA

L30X

AAGGCCTCGTTCGACATCCCCCTGACAGGGAAAGTAACGTTCCCTTTTCCCTTCGGGACAGGAAAGACAGGTG
 GGGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTT
 TCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGAGAGACC CGGAAAACCCGGAGGAAAGGGGGGAAAA
 TCCAAAACCCCTTATGGGGGGCCCCCTTTTAAAAGGGGAAAAAAGGAAACGCCCGGGG
 GAACCAACCCCAAAAACCCCTCCCTTTCGGATTTGGCCTGCCACCCCTTACAATGAGCCTGAATTCC
 TTATAATCCCAATCAAAATGTCGGGGGAATACCTTTCCCGTTTTGTTAACCCCGAA

L40X

AGCCTCGTTGACATCCTCGCTGACCGGCCCGTAACCGGGATTTTCCCTTCGGGACAGCAGAGACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCTTT
 AGTAGCCAGCAATTAGAGGGGGACCTCTGGAGACTGTGCGAGGCAAACCCGGGAAAGGGGGGATAAAA
 TCAAACTTCTTGCCTTTAAGTTGGGTACACCCCTGCGCCAATGGGGTAAAAAAGAAAAGCCC
 CCCCAGGGGGAGACAAACCCCAAAAACCATCTCCCTTTTGATAGTGGTCTGCGACCCCTTCCATGAA
 ACTGGGATCTCTTAATCTCGAATCTCAATGTCGCGGAAAACATTTCCCGGCTCTTGAACCCCGG
 GAAA

L50X

GATCACTCATACTCTTGACATCCTCCTCGAGTGGTCAAGGACACTGTTTTTTCGGGAAGGAGAGACAG
 GTGGTGCATGGCTGCTTCCGCTCTTGTTTTGATATGTTGGGTTAATTCCCGCACCGGGGGCACCCCTTA
 CCTTTGGTGCCTGATGATTTGACGTGGTCCCTCCTTCCCTCCGGGTTGAAAAACCGGAAGAAGGGGGG
 ACCAACCTAATCCTTTGGCCCTTAGAAAAGGGGTACCCCGTGGCGGAATTGACCCAACAAATGGAAA
 CCAAACTGAACATGAACAAAACCACTAATTTCCCTGTCCCTAAGGATTAAGCCTTTACCCCTTCC
 CTGGAGTTGGAACCGCTTGATAGGGTATTCAAATTTCCCGGGAATACCTTCCCGGCTTTTGAACCC
 CCGAAGGAA

L60X

TCGCTCGTTGACATCCCCCTCGACTAGTTCGGTAACGATACTTTTTCTTCGGGAGGGGAGACAGGTGGT
 CATGGTTGTCTTCCGCTCGTGTCTTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGGGCACCCCTGTTTTT
 GTGCCCCGACGATTTGAGGTGGTCCCTGCTTCGTCGCGCCGGGATAAACCGGAAGAAGGGGGGAATAAC
 GCAAATCATCCTGCCCTTATGATCTGGGCTACCCCTGCTTAAATTTGGCGCAAAAAAAGGAAACGGAC
 CCTGAAGAGTGAACAAAACCCCAAAAATCCCTCCCTTAGAATTGAGTCCGTTACCCACTTCCCTTGA
 GGCTGGATTCCTTTGAAATCGGTATTCAAATTTGCCCGGGGAACCCCTTCCCGGCTTTGGTACCCCGG
 AAGAA

L10J

AACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATCCCCCTGACCGGAGAGTAACGTATCCCTTTCTTTGGGACA
 GCGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCTTATCTTTCAGTAGCCAGCACGTAAAGTGGGCACTCTGGAGGGACTGCCAGGGACAACCTGGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
 AACAAAGGGAAGCAACCTGTGAAGGTGAGCAAATCCCAAAAATAAGGTCCCTAGTTCCGGGATTC

L20J

GGGAACCGGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGG
 AACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAATG
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG
 CATAAAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCTAAGCGGACCGTCTATA

L30J

ACGAAAAAACCAACCAAGCAGCACCTTACATCCAATAACGAAGAAGAGATCCTTTTCTTGCCTTAG
 GGGAAACATGAGACAGGTGGTGCATGGTAGTCTGAGTTCGAGTTCGAGATTTAGGGCTAAGTCCCGCA
 ACGACCGCAACCCCTGTCATTAGCTGGTACGCAAGGGCACTCTAAAGGGACTGCCAGGGACAACCTGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAA

AACAAGGGAAGCGACCCCGTGAAGGTGAGGCACCCCTATAAAAAAGGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGC
GAACG

L40J

AGGGGAAAAGACCATAACCTTCCCTGGCCTTACATAGGACGCGAAGAATTAGTGATTTTTTTGAGGTTAC
GGGAAAAACGGGGGGGGCAGGGTTTTTTTCAGCTGGTTTTTGTGAAATTTGGATTAAAGTCGGGAAACGAG
CCAACCCCTACTGATATGTTCCGACCATTAAGTTGGGCACCTTGTGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAG
GAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAA
ACAAAGGGAAGCGAACCTGTGAAGGGAAGCAAATCCCAAAAAAGCCGTCCCAGTTCGGATTGCAAGTCGG

L50J

ACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCT
TCGGGAACCGTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATA
AACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGCGCATACAAAAGGGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTG
GAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGATCAGATGTCCA

***Lactobacillus banda* TTGE**

TCTGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGT
TGGGCACTCTGGTGAAGTGCCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAA
TCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATACGTTCCCGGTTCTGGACGCACCGAAGAATTTTTGGGCGCGGCCT