

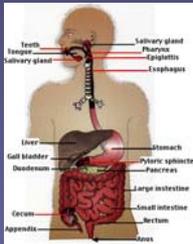


Alimentos Funcionales: Bases Científicas y Oportunidades
para el Sector Agroalimentario
Zaragoza, 3-7 abril, 2006

Estudio de casos: Probióticos

Leches fermentadas probióticas en la evolución de la
patología intestinal aguda y crónica

AGL2004-07285-CO2. Ganadería La Priégola



Teresa Requena y Carmen Peláez
Instituto del Frío-CSIC

AGL2004-07285-CO2

- Tarea 1.** Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.
- Tarea 2.** Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.
- Tarea 3.** Determinación de la capacidad de las cepas probióticas de colonizar el intestino analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el tracto gastrointestinal. Caracterización de la resistencia a los antibióticos suministrados en los tratamientos de las alteraciones intestinales.
- Tarea 4.** Evaluar la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leches fermentadas en la reducción de la diarrea asociada a tratamiento antibiótico y la disminución de recidivas en la enfermedad inflamatoria intestinal y establecer la relación existente con su capacidad de colonización intestinal.

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.

Tarea 2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.

Tarea 3. Determinación de la capacidad de las cepas probióticas de colonizar el intestino analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el tracto gastrointestinal. Caracterización de la resistencia a los antibióticos suministrados en los tratamientos de las alteraciones intestinales.

Tarea 4. Evaluar la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leches fermentadas en la reducción de la diarrea asociada a tratamiento antibiótico y la disminución de recidivas en la enfermedad inflamatoria intestinal y establecer la relación existente con su capacidad de colonización intestinal.

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.

Producto simbiótico: probiótico + prebiótico = Symbiotic
S. thermophilus, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*,
B. lactis

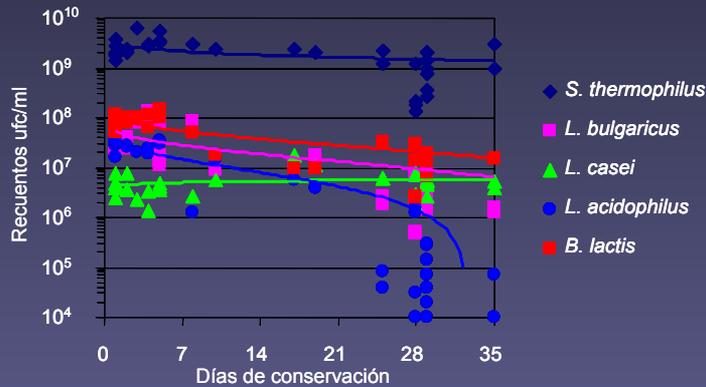
Ventajas frente al suministro de organismos liofilizados, comprimidos, etc :

☀ **Efecto tamponante y protector**

☀ **Adherencia al tratamiento**

| COMPOSICION QUIMICA | |
|---------------------|-----------|
| Proteína | 2.9% |
| Grasa | 1.8% |
| Extracto seco | 18.6% |
| Minerales | 0.9% |
| Galactosa | 0.6%-0.8% |
| Lactosa | 3%-2.7% |
| Prebiótico | 1.5% |
| Azúcares | 8-9% |

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto



| Días | Recuentos medios (ufc/ml) | | | | |
|-------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | <i>S. therm</i> | <i>L. bulg</i> | <i>L. casei</i> | <i>L. acido</i> | <i>B. lactis</i> |
| 1-2 | 2.4×10^9 | 3.8×10^7 | 4.7×10^6 | 3.0×10^7 | 8.4×10^7 |
| 3-5 | 3.2×10^9 | 3.9×10^7 | 3.3×10^6 | 2.7×10^7 | 1.1×10^8 |
| 8-10 | 2.7×10^9 | 8.6×10^6 | 4.1×10^6 | 7.7×10^6 | 3.4×10^7 |
| 17-19 | 2.1×10^9 | 1.5×10^7 | 4.4×10^6 | 4.7×10^6 | 1.0×10^7 |
| 25-29 | 1.6×10^9 | 3.2×10^6 | 5.0×10^6 | 2.8×10^5 | 1.6×10^7 |

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto

Modificación del producto para los estudios clínicos

| COMPOSICION QUIMICA | |
|---------------------|-----------|
| Proteína | 2.9% |
| Grasa | 1.8% |
| Extracto seco | 18.6% |
| Minerales | 0.9% |
| Galactosa | 0.6%-0.8% |
| Lactosa | 3%-2.7% |
| Prebótico | 2% |
| Azúcares | 0,5% |

Producto probiótico: *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *B.lactis* + prebiótico

Placebo: *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*. Sin prebiótico

Análisis clínico: aleatorizado, doble ciego y controlado. Grupos de intervención y placebo. 150 ml por día

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.

Desarrollo de un procedimiento de diferenciación y cuantificación de bacterias lácticas y bifidobacterias presentes en cultivos mixtos en leches fermentadas

Patentado

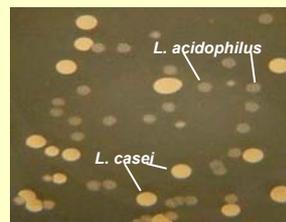
Medios de cultivo selectivos

S. thermophilus, *L. casei*, *B. lactis*

Medios de cultivo diferenciales

L. bulgaricus, *L. acidophilus*

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.



MEDIOS DE CULTIVO DIFERENCIALES

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.

Probiótico

| Especie | Recuentos (ufc/ml) en leche fermentada conservada a 4 °C | | | |
|------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 1 semana | 2 semanas | 3 semanas | 4 semanas |
| <i>S. thermophilus</i> | $2.1 (\pm 0.5) \times 10^9$ | $1.5 (\pm 0.6) \times 10^9$ | $1.7 (\pm 0.5) \times 10^9$ | $1.7 (\pm 0.9) \times 10^9$ |
| <i>L. bulgaricus</i> | $4.5 (\pm 2.0) \times 10^7$ | $1.8 (\pm 1.2) \times 10^7$ | $4.3 (\pm 0.7) \times 10^7$ | $6.4 (\pm 1.0) \times 10^6$ |
| <i>L. acidophilus</i> | $1.6 (\pm 0.8) \times 10^7$ | $1.6 (\pm 0.9) \times 10^7$ | $8.0 (\pm 0.5) \times 10^6$ | $3.8 (\pm 2.0) \times 10^6$ |
| <i>L. casei</i> | $3.2 (\pm 0.9) \times 10^6$ | $3.6 (\pm 2.0) \times 10^6$ | $3.2 (\pm 0.9) \times 10^6$ | $3.3 (\pm 1.6) \times 10^6$ |
| <i>B. lactis</i> | $1.2 (\pm 0.3) \times 10^8$ | $1.2 (\pm 0.7) \times 10^8$ | $1.0 (\pm 0.4) \times 10^8$ | $1.4 (\pm 0.4) \times 10^8$ |

Placebo

| Especie | Recuentos (ufc/ml) en leche fermentada conservada a 4 °C | | | |
|------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 1 semana | 2 semanas | 3 semanas | 4 semanas |
| <i>S. thermophilus</i> | $7.9 (\pm 2.1) \times 10^8$ | $1.2 (\pm 0.9) \times 10^9$ | $1.1 (\pm 0.6) \times 10^9$ | $8.8 (\pm 1.1) \times 10^8$ |
| <i>L. bulgaricus</i> | $1.9 (\pm 0.4) \times 10^8$ | $2.3 (\pm 0.7) \times 10^8$ | $1.8 (\pm 0.6) \times 10^8$ | $1.6 (\pm 0.3) \times 10^8$ |

Se mantienen niveles aceptables de bacterias probióticas durante la vida útil

AGL2004-07285-CO2

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.

Tarea 2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.

Tarea 3. Determinación de la capacidad de las cepas probióticas de colonizar el intestino analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el tracto gastrointestinal. Caracterización de la resistencia a los antibióticos suministrados en los tratamientos de las alteraciones intestinales.

Tarea 4. Evaluar la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leches fermentadas en la reducción de la diarrea asociada a tratamiento antibiótico y la disminución de recidivas en la enfermedad inflamatoria intestinal y establecer la relación existente con su capacidad de colonización intestinal.

Tarea 2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.

Desarrollo de un procedimiento de detección e identificación de diferentes especies de bacterias lácticas en cultivos mixtos con bifidobacterias

Patentado

PCR: regiones variables V1 y V2 del gen 16S rRNA (LAB) y del gen *tal* (*B. lactis*)

S. thermophilus: Thermfor: 5'-ACGCTGAAGAGAGGAGCTTG-3'
Thermrev: 5'-GCAATTGCCCTTTCAAATA-3'

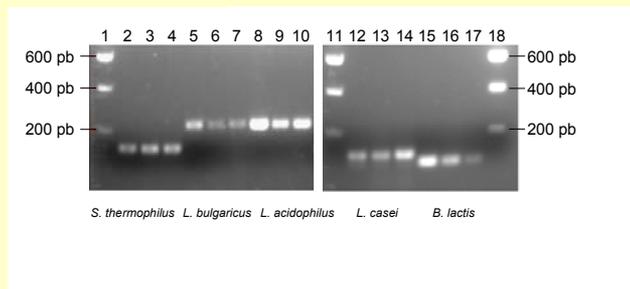
L. bulgaricus: Bulgfor: 5'-TCAAAGATTCCTTCGGGATG-3'
Bulgrev: 5'-TACGCATCATTGCCTTGTA-3'

L. acidophilus: Acidfor: 5'-AGCGAGCTGAACCAACAGAT-3'
Acidrev: 5'-AGGCCGTTACCCTACCAACT-3'

L. casei: Casfor: 5'-GCACCGAGATTCAACATGGAA-3'
Casrev: 5'-GCCATCTTTCAGCCAAGAACC-3'

B. lactis: Forlac: 5'-GCGCTGGGCTGCTCTGGAAGC-3'
Revlac: 5'-TGGCGACGAGCTCATCGACA TACT-3'

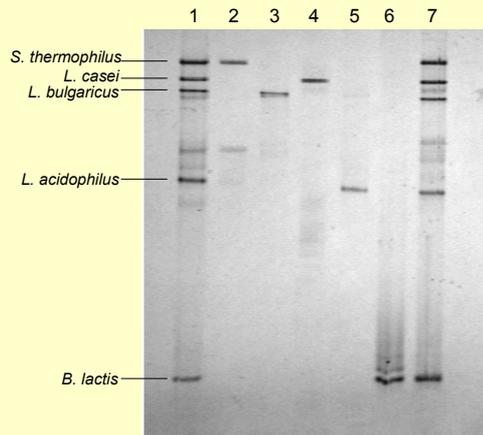
Tarea 2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.



Amplificación ADN de cada uno de los aislamientos

Tarea 2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.

ADN total de las muestras. PCR-DGGE



Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.

Tarea 2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.

Tarea 3. Determinación de la capacidad de las cepas probióticas de colonizar el intestino analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el tracto gastrointestinal. Caracterización de la resistencia a los antibióticos suministrados en los tratamientos de las alteraciones intestinales.

Tarea 4. Evaluar la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leches fermentadas en la reducción de la diarrea asociada a tratamiento antibiótico y la disminución de recidivas en la enfermedad inflamatoria intestinal y establecer la relación existente con su capacidad de colonización intestinal.

Tarea 3. Determinación de la capacidad de las cepas probióticas de colonizar el intestino analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el tracto gastrointestinal.

(en estudio)

3.1 Características de resistencia de las cepas en las condiciones del tracto gastrointestinal:

- Condiciones de simulación del TGI: soluciones artificiales y sucesivos vaciados gástricos a diferentes pHs
- Marcaje fluorescente (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit). Fluorimetría

3.2 Capacidad de adhesión intestinal y exclusión competitiva de patógenos :

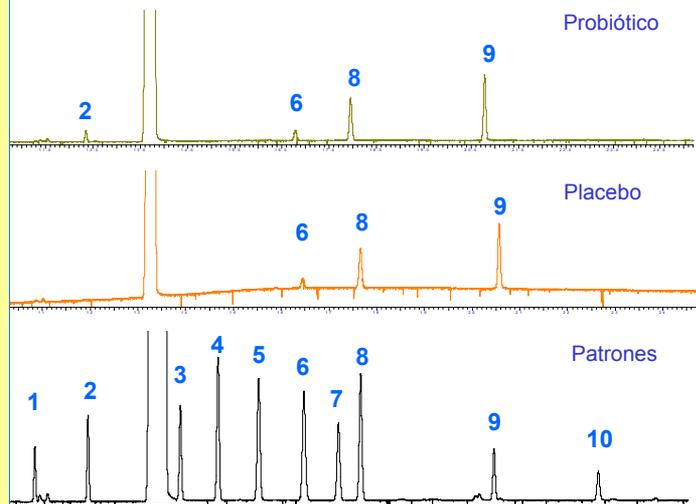
- Líneas celulares intestinales: HT-29, HT-20MTX y Caco-2

3.3 Metabolismo fermentativo y producción de sustancias antimicrobianas:

- Capacidad de fermentación de oligofruktosas: actividad fructofuranosidasa frente a rafilosa
- Producción de sustancias antimicrobianas

ACIDOS ORGÁNICOS DE CADENA CORTA (SCFA) DEL METABOLISMO FERMENTATIVO BACTERIANO EN PRODUCTO

- 1 Fórmico
- 2 Acético
- 3 Propiónico
- 4 Isobutírico
- 5 Butírico
- 6 Agua
- 7 Valérico
- 8 Patrón Interno
- 9 Láctico
- 10 Succínico



Tarea 3. Determinación de la capacidad de las cepas probióticas de colonizar el intestino analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el tracto gastrointestinal.

3.3 *Metabolismo fermentativo*

| Probiótico | Formación de SCFA (mM) en leche fermentada conservada a 4 °C | | | |
|----------------|--|----------------|---------------|----------------|
| | 1 semana | 2 semanas | 3 semanas | 4 semanas |
| Acético | 4.48 ± 1.40 | 4.32 ± 1.50 | 4.37 ± 0.58 | 5.36 ± 0.46 |
| Láctico | 81.18 ± 13.34 | 98.85 ± 13.52 | 106.93 ± 9.51 | 114.75 ± 18.35 |
| Placebo | | | | |
| Láctico | 84.96 ± 17.38 | 105.25 ± 13.92 | 109.82 ± 1.40 | 134.28 ± 15.97 |

AGL2004-07285-CO2

Tarea 1. Obtención de leches fermentadas que contengan bacterias probióticas y que mantengan la viabilidad en el producto.

Tarea 2. Caracterización molecular de las cepas probióticas para facilitar su identificación en el tracto intestinal.

Tarea 3. Determinación de la capacidad de las cepas probióticas de colonizar el intestino analizando su aptitud para acceder, implantarse y competir en el tracto gastrointestinal. Caracterización de la resistencia a los antibióticos suministrados en los tratamientos de las alteraciones intestinales.

Tarea 4. Evaluar la eficacia de las cepas probióticas suministradas en leches fermentadas en la reducción de la diarrea asociada a tratamiento antibiótico y la disminución de recidivas en la enfermedad inflamatoria intestinal y establecer la relación existente con su capacidad de colonización intestinal.

Tarea 4. Evaluar la eficacia de las cepas probióticas suministradas en los leches fermentadas en alteraciones intestinales y establecer la relación existente con su capacidad de colonización intestinal.

(en estudio)

Colonización de las cepas probióticas en los pacientes

4.1 Cuantificación de microbiota cultivable y PCR cuantitativo de bifidobacterias y lactobacilos.

4.2 Análisis en heces de la presencia de las cepas probióticas: PCR-DGGE

4.3 Determinación del contenido en ácidos grasos de cadena corta: CG

4.4. Evolución de marcados metabólicos de mejoría en la patología.

4.5 Relación entre la ingesta del producto probiótico, la evolución de marcadores metabólicos y la colonización intestinal



Alimentos Funcionales: Bases Científicas y Oportunidades para el Sector Agroalimentario Zaragoza, 3-7 abril, 2006

AGRADECIMIENTOS

Proyecto AGL2004-97285-CO2

Grupo de investigación del IF-CSIC

Centro de Investigaciones Biológicas
CIB-CSIC

Ganadería La Priégola

