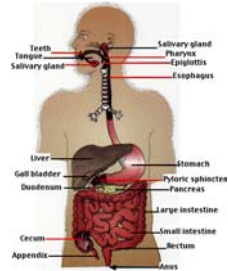




Alimentos Funcionales: Bases Científicas y Oportunidades para el Sector Agroalimentario Zaragoza, 3-7 abril, 2006

Microorganismos de Interés en Productos Funcionales: Bacterias Probióticas



Teresa Requena y Carmen Peláez
Instituto del Frío-CSIC



BACTERIAS PROBIÓTICAS

Microorganismos vivos empleados como
suplemento alimenticio que ejercen un efecto
beneficioso en la salud



B. bifidum

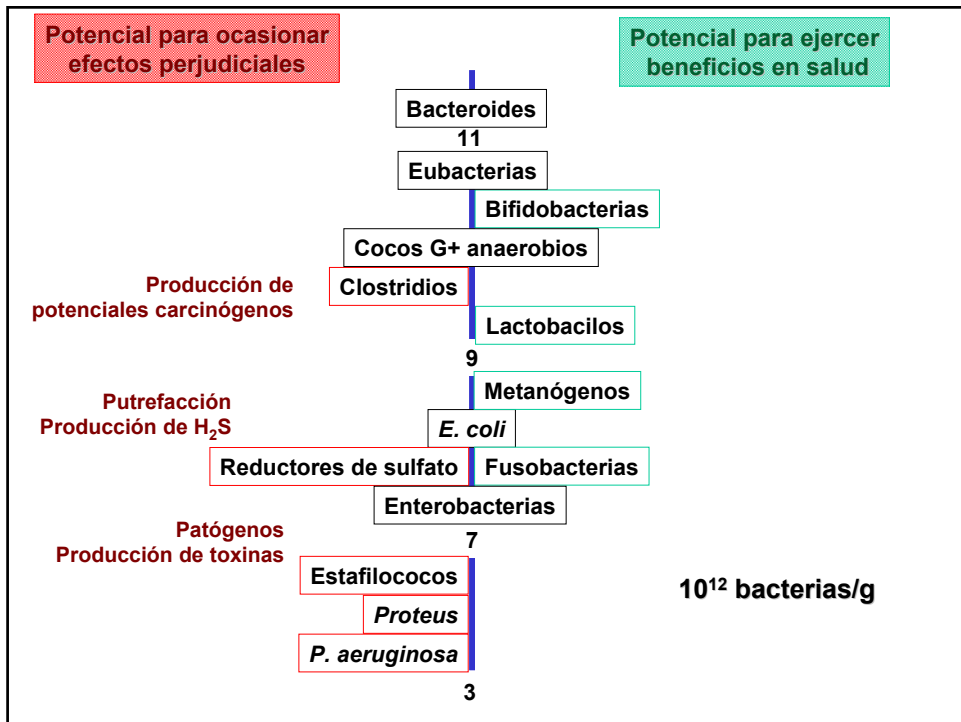


L. casei



Cápsulas

Lactobacillus ($>4 \times 10^9$)
Fructo-oligosacáridos
(FOS)





BACTERIAS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS

Lactobacillus

- L. acidophilus*
- L. delbrueckii ssp. bulgaricus*
- L. helveticus*
- L. johnsonii*
- L. reuteri*
- L. plantarum*
- L. casei*

Streptococcus thermophilus

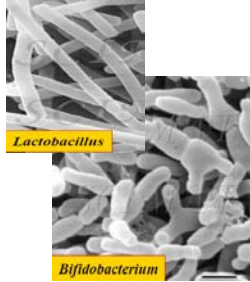
Enterococcus faecium

Pediococcus acidilactici

Saccharomyces boulardii

Bifidobacterium

- B. bifidum*
- B. longum*
- B. infantis*
- B. breve*
- B. adolescentis*



Lactobacillus

Bifidobacterium



POTENCIAL PARA EJERCER BENEFICIOS EN SALUD

Actividad Metabólica Beneficiosa en el Intestino

- **Actividad enzimática** sobre el contenido intestinal
- Producción de **ácidos grasos de cadena corta (SCFA)** (acético, propiónico, butírico)
 - ★ Recuperación de energía
 - ★ control pH
 - ★ absorción de minerales
- Reducción del **potencial oxido-reducción** en el contenido luminal
- **Resistencia contra patógenos** (competencia por nutrientes, sustancias antimicrobianas)



POTENCIAL PARA EJERCER BENEFICIOS EN SALUD

Mejoría Frente a Intolerancia a la Lactosa

Deficiencia de β -galactosidasa en Intestino Delgado

Hidrólisis de lactosa en colon

- 📦 Presión osmótica
- 📦 Producción de gases

Síntomas

Flatulencia

Dolor y distensión abdominal

Calambres

Diarrea osmótica

INCIDENCIA MUNDIAL DE INTOLERANCIA A LA LACTOSA

Grupo	% Intolerancia / hipolactasia
E.E. U.U.	
Blancos	10
Negros	70
Indios	67
AFRICA	
Uganda	72
Sudáfrica	90
Nigeria	70
EUROPA	
Suiza	17
Finlandia	17
Dinamarca	6
Polonia	29
Alemania	15
Grecia	38
España	
ASIA	
China	100
Japón	100
Filipinas	100
Países árabes	81
Australia	5



MEJORÍA FRENTE A LA INTOLERANCIA A LA LACTOSA

Efectos indirectos del yogur

- ⬇ Contenido de lactosa
- 👉 Textura y viscosidad ➡ 🏠 tiempo de tránsito intestinal

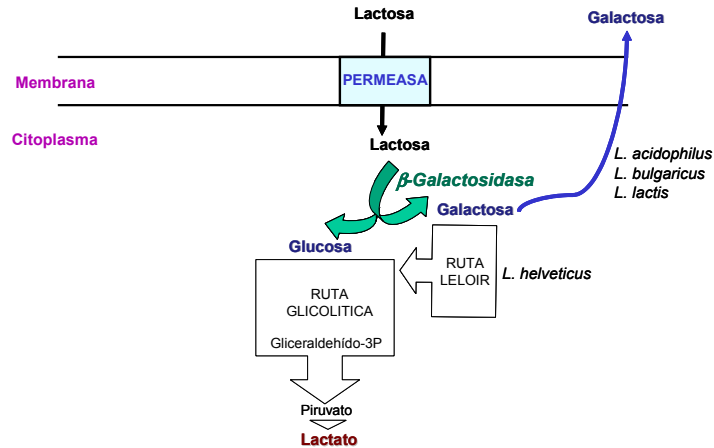
Efectos directos

- 🏠 Actividad β -galactosidasa en intestino
(permeabilización celular por sales biliares)



MEJORÍA FRENTE A LA INTOLERANCIA A LA LACTOSA

Lactobacilos homofermentativos



MEJORÍA FRENTE A LA INTOLERANCIA A LA LACTOSA

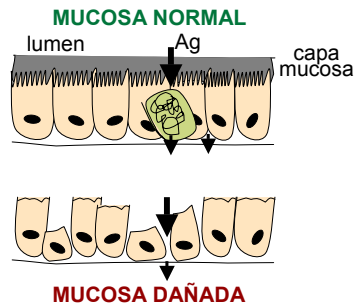
Posibilidades de Mejora de Probióticos

- ✳ Obtención de cepas de mayor actividad β -galactosidasa por clonación y sobreexpresión de genes *lac*
- ✳ Construcción de bacterias lácticas que sirvan de vehículos enzimáticos para liberación de β -galactosidasa en el intestino
- ✳ Caracterización molecular de mecanismos celulares de sensibilidad o resistencia a la bilis y las condiciones que controlan la lisis celular



POTENCIAL PARA EJERCER BENEFICIOS EN SALUD

Mejoría de Alteraciones Intestinales



antibióticos
radiaciones
estrés
dieta
virus

■ *Bifidobacteria, Lactobacillus*

■ Patógenos oportunistas

Aumento de la permeabilidad

Diarrea

Inflamación



Mejoría de Alteraciones Intestinales

Colonización y mantenimiento en intestino

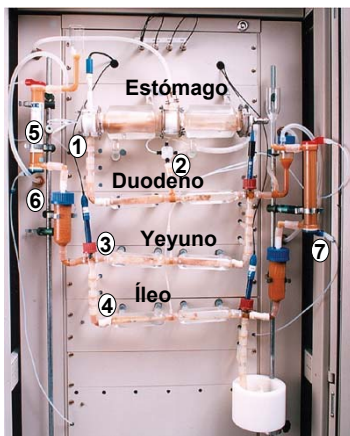
- ✱ Competición y exclusión de microorganismos indeseables
Competencia por zonas de adhesión y por nutrientes
- ✱ Actividad antimicrobiana
ácidos orgánicos
 H_2O_2
reuterina
bacteriocinas
- ✱ Eliminación de bacterias patógenas

Posibilidades de mejora de probióticos

- ✱ Conocimiento de las bases moleculares relacionados con los mecanismos de adherencia
- ✱ Metodologías que simulen las condiciones *in vivo*



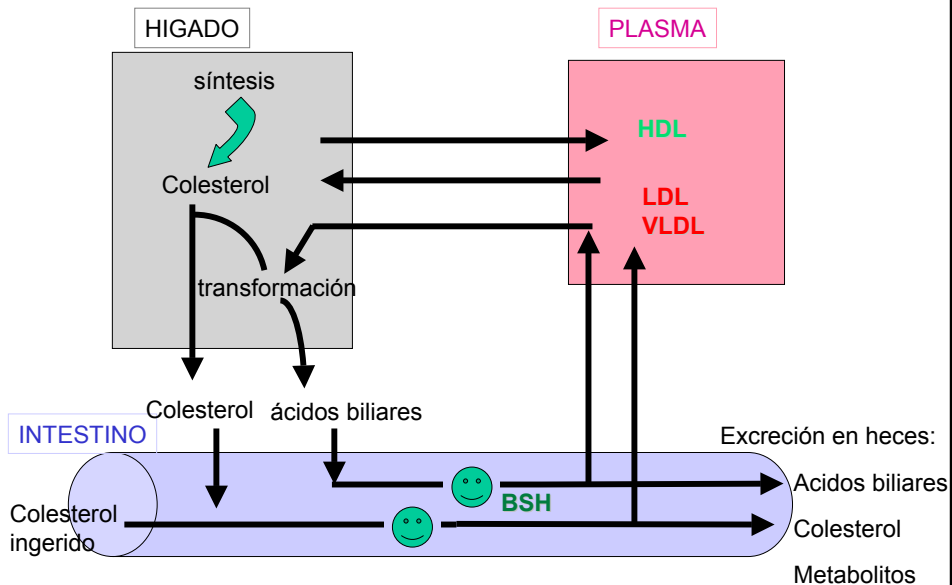
Modelo gastrointestinal (TNO Nutrition and Food Research, Holanda)



- (1) Secreción gástrica (lipasa, pepsina, HCl)
- (2) Secreción intestinal (jugo pancreático, bilis, NaHCO_3)
- (3) Electrodo de pH
- (4) Válvulas peristálticas
- (5) Membranas de fibra
- (6) Fluido de diálisis yeyunal
- (7) Fluido de diálisis ileal



Reducción del Colesterol





REDUCCIÓN DEL COLESTEROL

Producción de enzima hidrolasa de ácidos biliares (BSH)

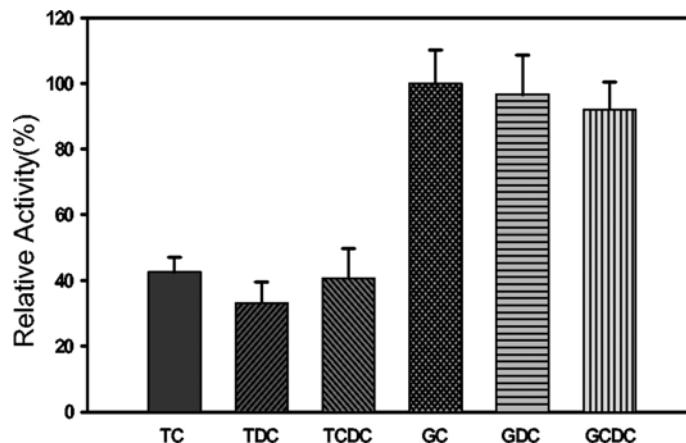
- Deconjugación de ácidos biliares
- Co-precipitación de colesterol con ácidos biliares deconjugados
- Excreción de colesterol precipitado

Asimilación de colesterol

Posibilidades en la mejora de probióticos

- *Clonación de BSH y estudio del efecto de esta actividad *in vivo*

Clonación de BSH de *B. bifidum* y actividad sobre ácidos biliares humanos



Especificidad de sustrato de BSH de *B. bifidum* ATCC 11863 sobre los principales ácidos biliares humanos: ácidos taurocólico (TC), taurodeoxicólico (TDC), tauroquenodeoxicólico (TCDC), glicocólico (GC), glicodeoxicólico (GDC), glycoquenodeoxicólico acid (GCDC). Kim *et al.* (2004) AEM 70:5603-5612



POTENCIAL PARA EJERCER BENEFICIOS EN SALUD

Prevención de cáncer

- ★ Suprimen el crecimiento de la microbiota intestinal productora de mutágenos, carcinógenos y precursores
- ★ Producción de compuestos antimutágenicos en colon
- ★ Ligado de compuestos mutagénicos y carcinogénicos que impide su absorción
- ★ Alteración de las condiciones fisiológicas del colon (descenso de pH) que afectan la actividad metabólica de la microbiota intestinal, la acción de ácidos biliares y la degradación bacteriana de ácidos biliares
- ★ Estimulación del sistema inmune



Prevención de cáncer

COMPUESTOS CARCINOGENICOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS DEL COLON

β -glucuronidasas - Nitroreductasas - Desaminasas

Fecapentenos
Nitrosaminas
Aminas heterocíclicas
Compuestos fenólicos
Agliconas
Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Amonio
Aminas
Compuestos indólicos
Compuestos glucurónidos
Diacilglicerol
Ácidos biliares secundarios



EFFECTOS DE PROBIÓTICOS EN DIVERSOS ESTADIOS DE CANCER

Estadio del cancer	Tipo del estudio	Resultados
Iniciación	<i>in vitro</i>	Inhibición de nitritos y nitrosaminas
	<i>in vitro</i>	Reacción con aminas heterocíclicas
	Animal	Prevención de lesión carcinogénica en células del colon
	Humano	Reducción de β -glucuronidasa en heces
	Humano	Reducción de metabolitos de putrefacción (<i>p</i> -cresol, indol, amoníaco)
Lesiones precancerosas	Animal	Supresión de la formación de focos criptales aberrantes
Cáncer	<i>In vitro</i>	Inhibición del crecimiento de línea celular humana del cáncer mamario
	Animal	Supresión de la incidencia de tumores del colon



POTENCIAL PARA EJERCER BENEFICIOS EN SALUD

Estimulación del sistema inmune

Respuesta inmune inespecífica (células fagocíticas)

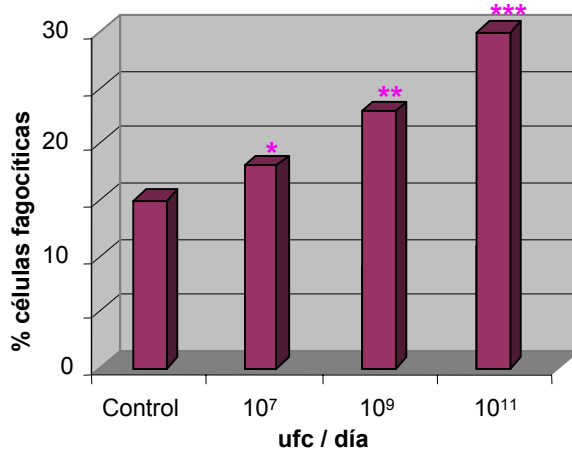
- ✳ Incremento de actividad fagocítica por macrófagos
- ✳ Producción de sustancias inhibitorias (enzimas lisosomiales, monoquinas)
- ✳ Aumento de actividad de células “killer” naturales (NK)

Respuesta inmune específica

- ✳ Inmunidad humoral (IgA, IgG, IgM)
- ✳ Inmunidad celular (linfocitos T: citoquinas)



Estimulación del sistema inmune



Ingestión de leche fermentada con *Lactobacillus rhamnosus*

ESTUDIOS DEL EFECTO DE LACTOBACILOS EN LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA HUMANA

TRATAMIENTO	EFECTO
Aporte de bacterias lácticas durante 28 días a ancianos	↑ % células B en sangre ↓ Inflamación colónica
Leche fermentada con <i>L. acidophilus</i> o bifidobacterias e inmunización oral con <i>Salmonella typhi</i>	↑ IgA específicas frente a <i>Salmonella</i> ↑ IgA totales
<i>Lactobacillus</i> GG liofilizados junto a vacuna frente a rotavirus	↑ Células secretoras de IgM frente a rotavirus ↑ IgA específicas de rotavirus
Lactobacilos liofilizados y yogur	↑ Interferon (INF)- γ sérico
Células mononucleares cultivadas con <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	↑ Producción interleuquina IL-1 β , IL-6, INF- γ



POTENCIAL PARA EJERCER BENEFICIOS EN SALUD

Utilización como vehículos de vacunas orales: clonación del fragmento C de la toxina tetánica en *Lactococcus lactis*

Selección de cepas

- ☀ Capacidad de colonizar el intestino (implantación/transitoria)
- ☀ Expresión de antígenos heterólogos (eficacia de transformación)
- ☀ Capacidad adyuvante intrínseca

Respuesta inmune específica al antígeno clonado

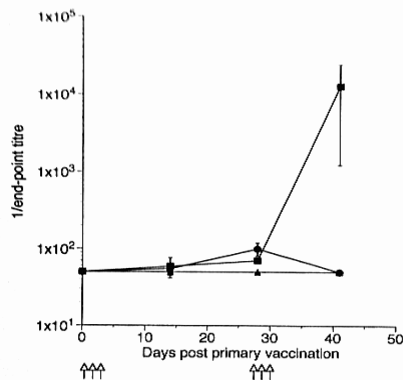


Figure 4. Serum antibody responses to TTFC following oral immunisation of groups of 4 female C57BL/6 mice with 5×10^9 c.f.u. of *L. lactis*. The days on which mice were inoculated are indicated with arrows. The TTFC specific serum antibody levels of mice inoculated with the TTFC expressor strain UCP1060 - ■ - reached high levels by day 40 giving mean end point titres of approximately 1/10000 compared to mean end point titres of approximately 1/50 for naive mice - ○ - and mice inoculated with the non expressor control strain of *L. lactis* - ▲ - (vertical bar = mean $\pm$ the standard error of the mean).



PREBIOTICOS

Ingredientes alimentarios no digestibles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de un determinado número de bacterias en el colon y que de este modo mejoran su efecto beneficioso para la salud



PREBIOTICOS

CARBOHIDRATOS (metabolismo sacarolítico de probióticos)

Disacáridos: lactulosa, lactitol

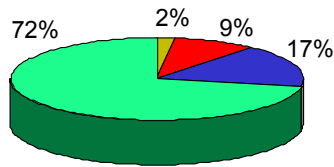
Oligosacáridos: (3-10) fructosa (FOS), galactosa, xilosa
derivado de soja (rafinosa + amilosa)

Polisacáridos: inulina, almidones no digeribles

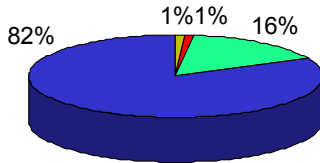
REQUISITOS:

- ★ No digeridos o absorbidos en la región anterior del intestino
- ★ Selectivos para un limitado número de bacterias residentes en colon y beneficiosas para la salud
- ★ Estimulen el crecimiento y/o metabolismo de probióticos de forma que éstos aumenten su proporción

EFFECTO DE PREBIOTICOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL



Control (Sacarosa)



Fructo-oligosacáridos (ingesta de 15 g/día)

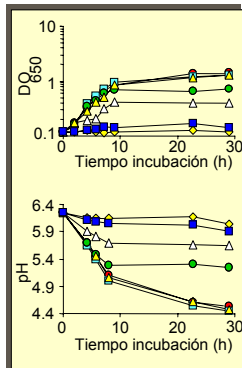
- Bifidobacterias
- Bacteroides
- Clostridios
- Fusobacterias



- ★ 1º Ingerido como suplemento de la dieta
- ★ 2º Llega intacto al colon
- ★ 3º Se fermenta selectivamente
- ★ 4º La composición de la microbiota cambia hacia una comunidad bacteriana más saludable



Utilización de prebióticos por *Bifidobacterium lactis*



Δ Sacarosa

□ Rafinosa

● Glucosa

Máximo crecimiento

○ Raftilosa (oligofructosa)

△ Raftilina LP (inulina bajo GP)

Buen crecimiento

◇ Raftilina HP (inulina alto GP)

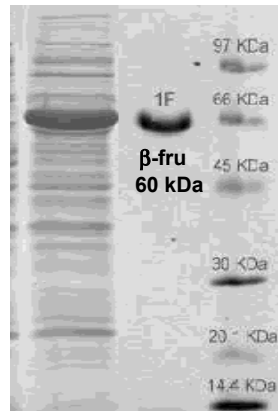
■ Fructosa

Mínimo crecimiento

B. lactis puede crecer con oligofructosa e inulina de bajo Grado de Polimerización



Utilización de prebióticos por *Bifidobacterium lactis*



Clonación, sobreexpresión y purificación
de la β -fructofuranosidasa de
Bifidobacterium lactis



Caracterización de β -Fru de *B. lactis*

<i>S. cerevisiae</i>	10-PLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEK	147-STQFRDPKVFWE	200-GYQYECPLIEVPT
<i>Z. mobilis</i>	30-PGFHVTLTGWMNDPNGLIFFKG	161-VAHFRDPRV WKE	225-AFMWECPDFFSLGN
<i>B. subtilis</i>	22-PQYHFTPEANWMNDPNGMVYYAG	153-KKDFRDPKVFWE	210-GGVWECPDFLFELPV
<i>B. longum</i>	41-PKYHIASNGGWINDPNGLCFYKG	176-DHHYRDPKV WKT	231-VFMLECPDFFPIKD
<i>B. lactis</i>	54-PKFHIASNGGWINDPNGLCRYNG	189-DHHFRDPKV WKT	244-VFMLECPDFFPIRD

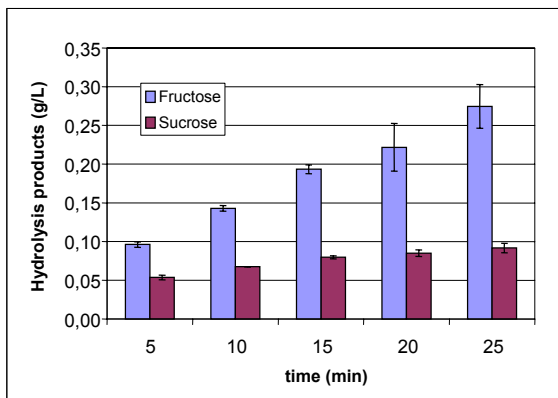
Familia 32 de glicosil hidrolasas

Aminoácidos que participan en el
proceso catalítico



Caracterización de β -Fru de *B. lactis*

Inulina bajo grado polimerización (α -D-Glc-(1-2)-(β -D-Fru) $_n$ [$n \approx 10$])



Liberación de fructosa=
10x liberación sacarosa



SIMBIOTICOS

Combinación de probióticos y prebióticos
para la mejora selectiva de la viabilidad e
implantación del suplemento microbiológico
añadido en el producto

Aplicaciones en la mejora de simbióticos

- ★ Prebióticos específicos para los probióticos del producto simbiótico
- ★ Nuevos oligosacáridos mediante ingeniería enzimática
- ★ Oligosacáridos multifuncionales (prebióticos, EPS, anti-microbianos)



Actividad antimicrobiana de quitosan-oligosacáridos (COS)

Concentración mínima inhibitoria (MIC) de diferentes quitosan-oligosacáridos (COS)

Especie	DD (%)	MW (kDa)	MIC (%)
<i>Escherichia coli</i>	85	12	0.1
<i>Escherichia coli</i>	85	6	0.06
<i>Escherichia coli</i> O-157	90	5–10	0.12
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	75	1–10	0.4
<i>Salmonella typhimurium</i>	75–90	1–10	0.125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50–90	5–10	0.25
<i>Micrococcus luteus</i>	90	5–10	0.031
<i>Streptococcus mutans</i>	90	5–10	0.008
<i>Streptococcus faecalis</i>	90	5–10	0.03
<i>Staphylococcus epidermis</i>	75–90	5–10	0.063
<i>Staphylococcus aureus</i>	50–90	1–10	0.125
<i>Bacillus subtilis</i>	75–90	5–10	0.125
<i>Bacillus cereus</i>	75–90	1–10	0.125
<i>Lactobacillus plantarum</i>	85	12	0.06
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	85	12	0.0005

COS: polímeros *N*-desacetilados de *N*-acetil-d-glucosamina (GlcNAc). DD: Grado de desacetilación
MIC: mínima concentración de COS a la que el crecimiento bacteriano se inhibe completamente



Aspectos prácticos de la utilización de probióticos

Aspectos tecnológicos

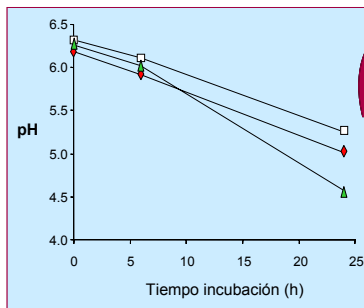
- ★ Bajo pH de productos lácteos fermentados (4,0 - 4,5) [cultivos iniciadores]
- ★ Células viables (10^6 y 10^8 ufc/ml)

Factores que afectan la viabilidad de probióticos en productos lácteos fermentados

- ★ Interacción con el cultivo iniciador
- ★ Composición del medio de fermentación (WPC, prebióticos)
- ★ Presencia de oxígeno
- ★ Inóculo
- ★ Acidez

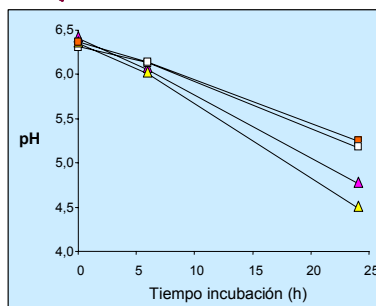


Viabilidad de *B. lactis* en leche con CMP y WPC



□ Control ♦ CMP ▲ WPC

CMP y WPC mejoran el crecimiento de *B. lactis* en leche



■ Minerales ▲ WPC > 3000 Da ▼ WPC < 3000 Da

Fracción peptídica < 3000 Da del WPC contiene mayor capacidad bifidogénica



Actividad proteolítica de *B. lactis*

Substrato	Actividad específica (U/mg)	
	MRS	Leche
Arg-Pro-p-nitroanilida	ND	0.057 ± 0.004
Pro-p-nitroanilida	ND	0.129 ± 0.002
Leu-p-nitroanilida	ND	0.060 ± 0.004
Lys-p-nitroanilida	ND	0.026 ± 0.002

ND: No detectada

Aminopeptidasas

X-prolyldipeptidyl aminopeptidase

Proline iminopeptidase

Aminopeptidasas generales

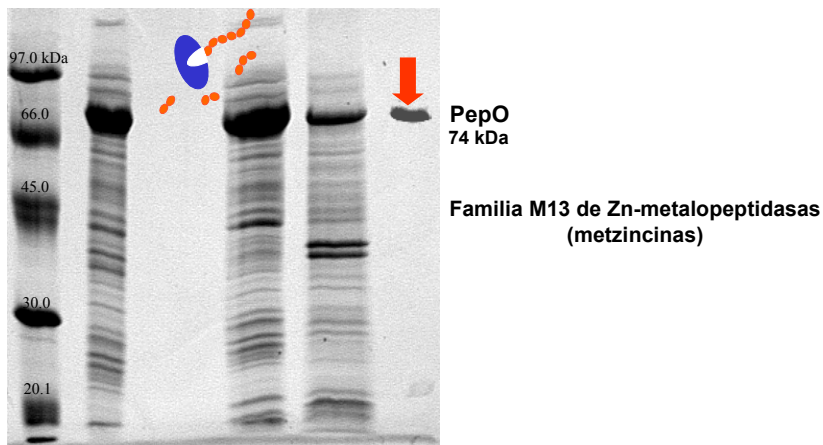
☞ Mayores actividades aminopeptidasas en células crecidas en leche

☞ Elevada actividad prolina iminopeptidasa



Actividad proteolítica de *B. lactis*

Clonación, sobreexpresión y purificación de la endopeptidasa PepO de *B. lactis*



Actividad proteolítica de *B. lactis*

Substrate specificity and cleavage sites of recombinant PepO of *Bifidobacterium lactis*

Substrate	Relative activity (%) ^a	Cleavage sites
Substance P	100.0 (± 0.0)	R-P- ² K-P-Q-Q- ¹ F-F-G-L-M-NH ₂
Angiotensin	93.8 (± 3.3)	D-R-V-Y- ² I-H-P- ¹ F-H-L
Bradykinin	38.8 (± 7.8)	R-P- ² P-G- ² F-S-P- ¹ F-R
Met-enkephalinamide	10.5 (± 2.7)	Y-G-G- ¹ F-M-NH ₂
Met-enkephalin	10.2 (± 4.8)	Y-G-G- ¹ F-M
α _{s1} -casein(f1-23)	2.2 (± 0.06)	R-P-K-H-P-I-K-H-Q-G-L-P-Q- ¹ E-V-L-N-E-N-L-L-R-F

^a Activity expressed as mean ± SD (n = 3) relative to the activity towards substance P, taken as 100%

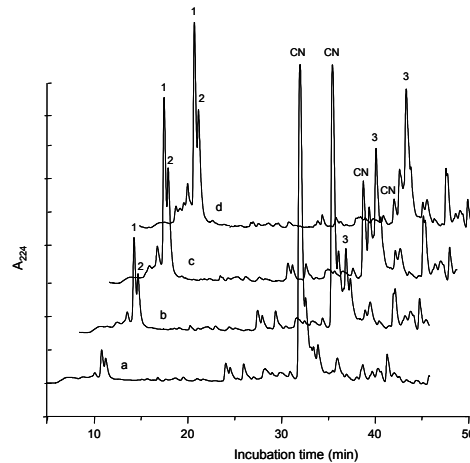
1 Primary cleavage site.

2 Secondary cleavage site.

Janer *et al.* (2005) AEM 71:8460-8465



Actividad proteolítica de *B. lactis*



Reverse-phase HPLC pattern of (a) pure α s1-casein(f1-23) [CN] and its hydrolysis products (peaks 1, 2, and 3) after (b) 20 min, (c) 40 min and (d) 60 min incubation with *Bifidobacterium lactis* recombinant PepO



Aspectos prácticos de la utilización de probióticos

Aspectos fisiológicos

- ✳ Adhesión y colonización
(Aumentar la capacidad de colonización, expresión de proteínas de adherencia)
- ✳ Resistencia a la acidez gástrica y secreciones biliares
(Obtención de cepas con mejoradas propiedades de resistencia)

Requisitos de las cepas probióticas:

- ★ Origen humano (asegura mayor adaptación y viabilidad)
- ★ Cepas no patógenas (*Lactobacillus*: GRAS)



Bifidobacterias con mejorada resistencia a sales biliares

Adhesión a mucus de colon humano de *L. rhamnosus* GG y cepas de *Bifidobacterium* (original y variantes con mejorada resistencia a sales biliares) Gueimonde et al. (2005) IJFM 101:341-346

Cepa	Adhesión a mucus humano (%)
<i>L. rhamnosus</i> GG	18.5±1.5
<i>B. bifidum</i> M6	4.8±3.6 ^a
<i>B. bifidum</i> M6dCo	16.0±5.1 ^b
<i>B. bifidum</i> PBT	11.1±4.2
<i>B. bifidum</i> PBTdOx	15.2±0.6
<i>B. animalis</i> IPLA B658	9.6±0.5 ^a
<i>B. animalis</i> 658dOx	15.3±3.3 ^b
<i>B. bifidum</i> A8	5.3±2.1 ^a
<i>B. bifidum</i> A8dOx	16.5±2.4 ^b
<i>B. bifidum</i> A1	19.6±1.2
<i>B. bifidum</i> A1dOx	17.9±1.3
<i>B. longum</i> NIZO B667	3.7±0.8 ^a
<i>B. longum</i> 667dCo	15.0±5.5 ^b
<i>B. animalis</i> IPLA 4549	6.1±1.1 ^a
<i>B. animalis</i> 4549dCo	9.2±1.1 ^a
<i>B. animalis</i> 4549dOx	14.5±3.6 ^b

dOx, variantes resistentes a Ox-gall; dCo, variantes resistentes a colato
Diferentes superíndices en el mismo grupo difieren significativamente ($P<0.05$).



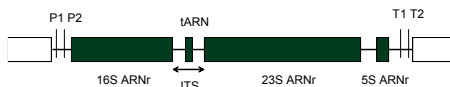
Aspectos prácticos de la utilización de probióticos

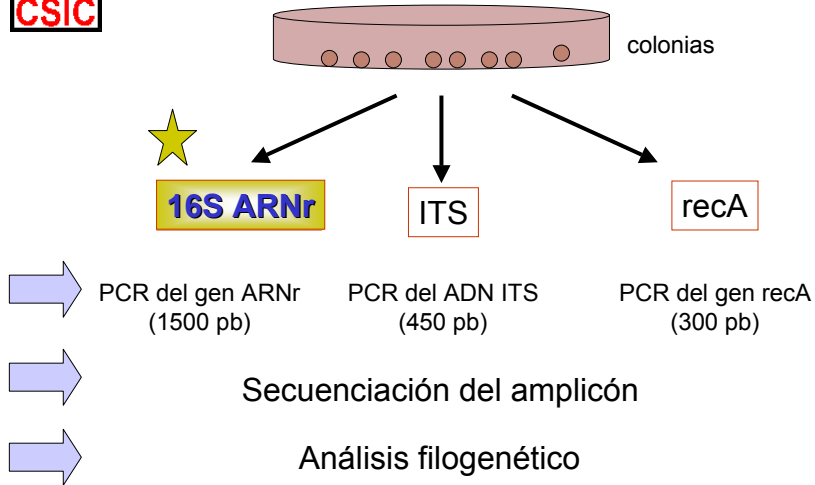
Aspectos genéticos

- ✳ Correcta identificación de bacterias probióticas
- ✳ Seguimiento específico de las cepas empleadas y vinculación a los efectos beneficiosos observados

Empleo de secuencias presentes universalmente en bacterias y altamente conservadas

- ➡ Análisis de la secuencia del ARNr 16S
- ➡ Análisis del gen *recA*
- ➡ Secuencias ITS

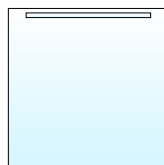
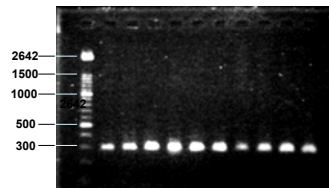
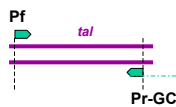




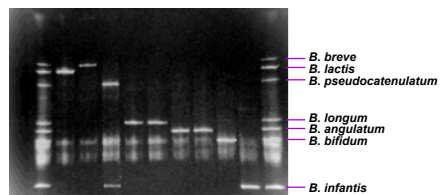
CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

PCR-ELECTROFORESIS EN GEL DESNATURALIZANTE EN GRADIENTE

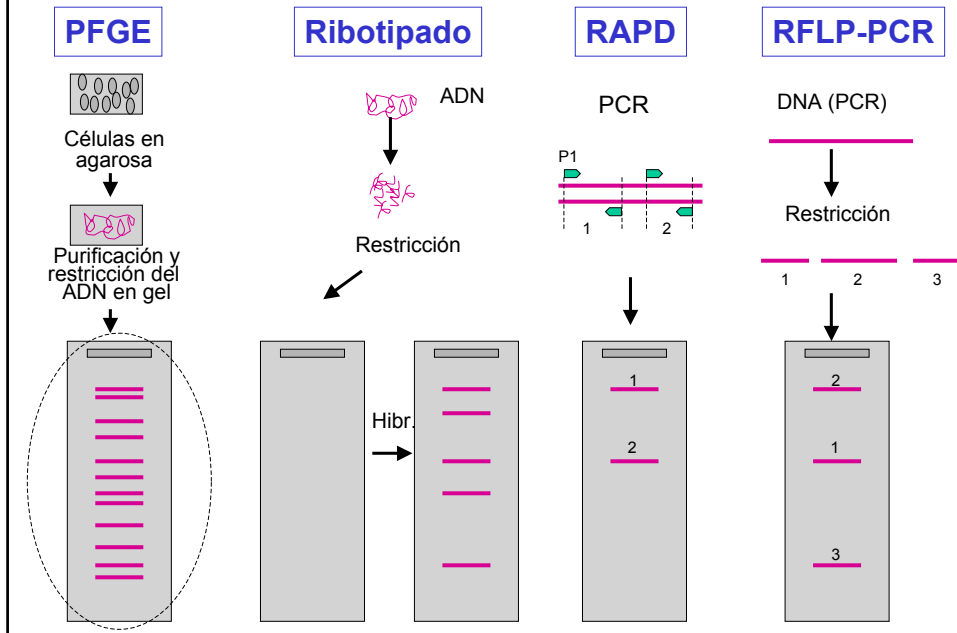
PCR (primer GC)



Urea
Formamida
60 °C



SEGUIMIENTO ESPECIFICO DE CEPAS



CARACTERISTICAS DE CEPAS PROBIOTICAS

- ➡ Identificación taxonómica y seguimiento molecular precisos
- ➡ Origen humano (asegura su viabilidad)
- ➡ Demostrada capacidad para producir efectos beneficiosos de salud
- ➡ Resistencia a ácidos, bilis y antimicrobianos de la microbiota intestinal
- ➡ Adherencia y colonización del tracto intestinal humano
- ➡ Capacidad para sobrevivir, proliferar y presentar actividad metabólica *in situ*
- ➡ Producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, ácidos orgánicos)
- ➡ Antagonismo frente a bacterias cariogénicas y patógenas
- ➡ Seguridad en su uso clínico y alimentario
- ➡ Viabilidad en altas poblaciones (10^6 - 10^8)
- ➡ Estabilidad genética
- ➡ Aporte de cualidades organolépticas deseables en el producto fermentado