



Facultad de Veterinaria

**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**TESIS DOCTORAL**

***Adición de probióticos y prebióticos a  
fórmulas infantiles y su efecto sobre la  
biodisponibilidad mineral***

Darío Pérez Conesa  
Murcia 2003

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 13 |
| <b>II. OBJETIVOS</b> .....   | 15 |
| <b>III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 16 |
| <b>1. LA ALIMENTACIÓN INFANTIL</b> .....   | 16 |
| 1.1. Recuerdo histórico.....   | 16 |
| 1.2. Maduración morfológica y funcional del tubo digestivo del niño.....                               | 16 |
| 1.3. Alimentación en la primera infancia.....  | 18 |
| 1.4. Nutrición y metabolismo de los minerales.....   | 24 |
| 1.4.1. Necesidades nutricionales de los minerales.....   | 30 |
| <b>2. ALIMENTOS FUNCIONALES</b> .....  | 32 |
| 2.1. Concepto de alimento funcional.....   | 32 |
| 2.2. Dianas que presentan un mayor interés en el desarrollo de nuevos alimentos.....                   | 33 |
| 2.3. Proclamas alimentarias reivindicativas de efectos beneficiosos para la salud (Health claims)..... | 34 |
| 2.4. Oligosacáridos no digeribles (OND) como ingredientes alimenticios funcionales.....                | 35 |
| <b>3. BIFIDOBACTERIAS</b> .....  | 37 |
| 3.1. Descubrimiento e historia.....  | 37 |
| 3.2. Morfología, fisiología, metabolismo y ecología.....   | 37 |
| 3.3. Medios y parámetros de cultivo.....   | 40 |
| <b>4. FLORA INTESTINAL HUMANA</b> .....  | 43 |
| 4.1. Adquisición de la microbiota del intestino por los neonatos.....                                  | 44 |
| 4.2. Desarrollo de la flora intestinal y factores influyentes.....                                     | 45 |
| 4.3. El colon humano.....  | 48 |
| 4.3.1. La microflora del colon.....  | 48 |
| 4.3.2. Efectos fisiológicos de la microflora del colon.....  | 49 |
| 4.3.3. Bifidobacterias y sus efectos beneficiosos en la salud humana.....                              | 49 |
| 4.3.4. Características de la fermentación en el colon humano.....                                      | 50 |
| 4.3.5. El colon y la acción de su microbiota en la infancia.....                                       | 53 |
| <b>5. BENEFICIOS DE LA LECHE MATERNA</b> .....   | 54 |
| 5.1. Oligosacáridos no digeribles (OND) de la leche humana.....  | 55 |
| <b>6. PROBIÓTICOS</b> .....  | 59 |
| 6.1. Definición y evolución del término probiótico.....  | 59 |
| 6.2. Criterios que deben cumplir los probióticos.....  | 59 |
| 6.3. Microorganismos utilizados comúnmente como probióticos.....                                       | 61 |
| 6.4. Valoración <i>in vitro</i> de cepas bacterianas como potenciales probióticos.....                 | 62 |
| 6.4.1. Resistencia a la acidez gástrica.....   | 62 |
| 6.4.2. Resistencia a los ácidos biliares.....  | 62 |
| 6.4.3. Adherencia de los aislados bacterianos del íleon a las líneas celulares humanas.....            | 63 |
| 6.5. Efectos de los probióticos.....   | 63 |
| 6.6. Eficacia y seguridad de los probióticos.....  | 66 |
| <b>7. PREBIÓTICOS</b> .....  | 68 |

|   |            |
|---|------------|
| 7.1. Definición y criterios que debe cumplir un prebiótico.....   | 68         |
| 7.2. Oligosacáridos (OS) y Oligosacáridos no digeribles (OND).....  | 68         |
| 7.2.1. Propiedades de los OS.....   | 69         |
| 7.2.2. Tipos de OS.....   | 70         |
| 7.3. Efecto fisiológico de los OND a nivel sistémico.....   | 73         |
| 7.4. Galactooligosacáridos (GOS).....   | 76         |
| 7.4.1. Producción y propiedades de los GOS.....   | 76         |
| 7.4.2. Efectos de los GOS sobre la salud humana.....  | 76         |
| 7.5. Efecto de los OND en la absorción mineral.....   | 80         |
| 7.5.1. Estudios en animales.....  | 81         |
| 7.5.2. Estudios en humanos.....   | 88         |
| 7.6. Métodos para evaluar el potencial de los prebióticos.....  | 90         |
| 7.7. Empleo de oligosacáridos (OS) frente a la fibra dietética (FD).....  | 91         |
| 7.8. Dosis y efectos secundarios.....   | 92         |
| <b>8. SIMBIÓTICOS.....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>9. OLIGOSACÁRIDOS (OS) EN LA ALIMENTACIÓN INFANTIL.....</b>  | <b>94</b>  |
| <b>IV. MATERIAL Y METODOS.....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>2. MATERIALES.....</b>   | <b>98</b>  |
| 2.1. Alimentos problema.....  | 98         |
| 2.1.1. Fórmulas infantiles.....   | 98         |
| 2.1.2. Dieta de mantenimiento para animales de laboratorio.....   | 100        |
| 2.2. Bifidobacterias.....   | 100        |
| 2.3. Oligosacáridos no digeribles (OND).....  | 100        |
| <b>3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA.....</b>   | <b>102</b> |
| <b>1<sup>er</sup> ESTUDIO</b>   |            |
| 3.1. Evaluación <i>in vitro</i> del crecimiento de bifidobacterias y del cambio de pH del medio de cultivo, en presencia de diferentes oligosacáridos (OS)..... | 102        |
| <b>2° ESTUDIO</b>   |            |
| 3.2. Evaluación del grado de viabilidad de las bifidobacterias en las fórmulas infantiles.....  | 105        |
| 3.3. Composición flora intestinal de bebés alimentados con fórmula infantil probiótica.....   | 107        |
| <b>3<sup>er</sup> ESTUDIO</b>   |            |
| 3.4. Análisis nutricional de las dietas empleadas en el presente estudio.....   | 114        |
| 3.4.1. Determinación de la humedad.....   | 114        |
| 3.4.2. Determinación de la proteína bruta.....  | 115        |
| 3.4.3. Determinación de la grasa bruta.....   | 117        |
| 3.4.4. Determinación de las cenizas.....  | 118        |
| 3.4.5. Determinación de la fibra dietética total (FDT).....   | 118        |
| 3.4.6. Determinación de los hidratos de carbono.....  | 120        |
| 3.4.7. Valor energético.....  | 121        |
| 3.4.8. Determinación de la composición mineral (Ca, Mg y Fe).....   | 121        |
| 3.4.9. Determinación de fósforo (P) total.....  | 124        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.5. Estudio <i>in vivo</i> con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral.....                        | 126        |
| 3.5.1. Animales.....   | 126        |
| 3.5.2. Dietas.....   | 127        |
| 3.5.3. Pauta de recogida de datos y toma de muestras.....  | 127        |
| 3.5.3.1. Ingesta de alimento, toma de peso en vivo, recogida de heces y orina.....   | 127        |
| 3.5.3.2. Anestesia y disección .....   | 129        |
| 3.5.4. Preparación de muestras.....  | 131        |
| 3.5.5. Determinación de parámetros hematológicos.....  | 133        |
| 3.5.6. Determinación de parámetros bioquímicos.....  | 133        |
| 3.5.7. Recuento de bifidobacterias fecales de las ratas.....   | 135        |
| 3.5.8. Determinación del contenido mineral.....  | 137        |
| 3.5.9. Determinación del contenido mineral en la fase líquida y sólida de los contenidos del ciego y del colon.....  | 138        |
| 3.5.10. Análisis histológico del epitelio de la pared del ciego y colon.....   | 139        |
| 3.5.11. Cálculos realizados para la evaluación del balance mineral.....  | 143        |
| 3.5.12. Validación de la determinación mineral.....  | 143        |
| <b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>  | <b>144</b> |
| <b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>  | <b>145</b> |
| <b>1<sup>er</sup> ESTUDIO</b>  |            |
| 1. Evaluación <i>in vitro</i> del crecimiento de bifidobacterias y del cambio de pH del medio de cultivo, en presencia de diferentes oligosacáridos no digeribles (OND)..... | 145        |
| <b>2<sup>o</sup> ESTUDIO</b>   |            |
| 2. Evaluación del grado de viabilidad de las bifidobacterias en las fórmulas infantiles.....   | 153        |
| 3. Composición de la flora intestinal de bebés alimentados con fórmula infantil probiótica.....  | 157        |
| <b>3<sup>er</sup> ESTUDIO</b>  |            |
| 4. Estudio <i>in vivo</i> con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral.....                          | 165        |
| 4.1. Efecto sobre las medidas fisiológicas y tasa de crecimiento de las ratas.....   | 165        |
| 4.2. Parámetros hematológicos y bioquímicos en las ratas.....  | 170        |
| 4.3. Recuento microbiológico total y de bifidobacterias fecales en heces de ratas.....   | 174        |
| 4.4. Balances minerales.....   | 176        |
| 4.4.1. Balance mineral del calcio.....   | 176        |
| 4.4.2. Balance mineral del magnesio.....   | 181        |
| 4.4.3. Balance mineral del fósforo.....  | 185        |
| 4.4.4. Balance mineral del hierro.....   | 188        |
| 4.5. Efecto sobre el ciego y el colon de las ratas.....  | 192        |
| 4.5.1. Peso y valor de pH del ciego y del colon y sus contenidos.....  | 192        |
| 4.5.2. Distribución de los minerales en la fase líquida y sólida del contenido del ciego y del colon....   | 195        |
| 4.5.3. Morfología de la mucosa del ciego y del colon.....  | 198        |
| 4.6. Efecto sobre la mineralización del fémur y la tibia de las ratas.....   | 201        |
| 4.7. Relación entre las variables morfológicas y pH del intestino grueso, la biodisponibilidad   |            |

|  |     |
|--|-----|
| mineral y la mineralización ósea.....  | 204 |
| 4.7.1. Efecto del peso inicial de las ratas en los pesos de los órganos diana (ciego, colon, fémur y tibia).....   | 204 |
| 4.7.2. Estudio de correlación entre los diferentes parámetros morfológicos y pH del intestino grueso, la biodisponibilidad mineral y la mineralización ósea..... | 204 |
| 4.7.3. Estudio de regresión entre la absorción mineral, los parámetros morfológicos y el pH del intestino grueso.....  | 209 |
| 4.7.4 Análisis factorial.....  | 214 |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b> .....  | 221 |
| <b>VII. RESUMEN</b> .....  | 223 |
| <b>VIII. SUMMARY</b> .....   | 225 |
| <b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 227 |
| <b>X. Addition of probiotics and prebiotics to infant formulas and their effect on mineral bioavailability</b> .....   | 252 |
| <b>I. INTRODUCTION</b> .....   | 253 |
| <b>II. OBJECTIVES</b> .....  | 255 |
| <b>III. MATERIAL AND METHODS</b> .....   | 256 |
| Experimental schedule.....   | 256 |
| <b>1<sup>st</sup> STUDY</b>  |     |
| <i>In vitro</i> evaluation of bifidobacteria growth and pH variation of the culture broth with different non-digestible oligosaccharides (NDO).....              | 258 |
| <b>2<sup>nd</sup> STUDY</b>  |     |
| Infant formulas.....   | 259 |
| Viability of bifidobacteria in commercial powder infant formula.....   | 261 |
| Composition of faecal microflora in infants fed control or probiotic formula during the first year of life.....  | 262 |
| <b>3<sup>rd</sup> STUDY</b>  |     |
| Nutritional composition of the experimental diets.....   | 263 |
| <i>In vivo</i> study with rats of the effect of follow-up infant formulas containing probiotics, prebiotics and synbiotics on mineral absorption.....            | 265 |
| Animals.....   | 265 |
| Diets.....   | 265 |
| Collection and processing of samples.....  | 266 |
| Determination of the haematological and biochemical parameters.....  | 268 |
| Enumeration of total bacteria and bifidobacteria in faeces of rats.....  | 269 |
| Determination of the mineral content.....  | 270 |
| Determination of the mineral content in the solid and liquid phases of the contents of cecum and colon.....  | 270 |
| Histologist study of the epithelium of the wall of cecum and colon.....  | 271 |
| Calculations for the evaluation of mineral balance.....  | 272 |
| Validation of mineral determination.....   | 272 |
| Statistical analysis.....  | 272 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>IV. RESULTS AND DISCUSSION</b> .....   | <b>274</b> |
| <b>1<sup>st</sup> STUDY</b>   |            |
| <i>In vitro</i> evaluation of bifidobacteria growth and pH variation of the culture broth with different non-digestible oligosaccharides (NDO).....   | <b>274</b> |
| <b>2<sup>nd</sup> STUDY</b>   |            |
| 1. Viability of bifidobacteria in commercial powder infant formula.....   | <b>281</b> |
| 2. Composition of faecal microflora in infants fed control or probiotic formula during the first year of life.....                                    | <b>284</b> |
| <b>3<sup>rd</sup> STUDY</b>   |            |
| <i>In vivo</i> study with rats of the effect of follow-up infant formulas containing probiotics, prebiotics and synbiotics on mineral absorption..... | <b>292</b> |
| 1. Effect on physiological measurements and growth ratio of rats.....   | <b>292</b> |
| 2. Haematological and biochemical parameters in rats.....   | <b>295</b> |
| 3. Enumeration of total bacteria and bifidobacteria in faeces of rats.....  | <b>296</b> |
| 4. Mineral balances.....  | <b>299</b> |
| 4.1. Balance of calcium.....  | <b>299</b> |
| 4.2. Balance of magnesium.....  | <b>303</b> |
| 4.3. Balance of phosphorous.....  | <b>305</b> |
| 4.4. Balance of iron.....   | <b>309</b> |
| 5. Effect on cecum and colon of rats.....   | <b>312</b> |
| 5.1. Cecal and colonic parameters (weight and pH).....  | <b>312</b> |
| 5.2. Mineral distribution in the liquid and solid phase of cecal and colonic contents.....  | <b>314</b> |
| 5.3. Epithelial cell proliferation in cecal and colonic mucosa of rats.....   | <b>315</b> |
| 6. Effect on mineral content of the femur and tibia in rats.....  | <b>319</b> |
| 7. Relationship among morphology variables and pH of the large intestine content, mineral bioavailability and bone mineralization.....                | <b>321</b> |
| 7.1. Effect of initial body weight on the weight of target organs (cecum, colon, femur and tibia).....  | <b>321</b> |
| 7.2. Correlation study among morphology parameters, pH of the large intestine content, mineral bioavailability and bone mineralization.....           | <b>322</b> |
| 7.3. Regression study among mineral absorption, morphological parameters and the pH of the large intestinal content.....                              | <b>323</b> |
| 7.4. Factorial analysis.....  | <b>325</b> |
| <b>V. CONCLUSIONS</b> .....   | <b>331</b> |

## Índice de Tablas

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Composición de la leche humana y de la leche de vaca.....                                | <b>21</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Recomendaciones para la elaboración de una fórmula de continuación.....                  | <b>23</b> |
| <b>Tabla 3.</b> Recomendaciones diarias de minerales en los tres primeros años de vida.....              | <b>30</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Especies del género <i>Bifidobacterium</i> en función de su origen.....                  | <b>38</b> |
| <b>Tabla 5.</b> Medios de cultivo básicos y no selectivos para bifidobacterias en productos lácteos..... | <b>41</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabla 6.</b> Medios de cultivo selectivos para el recuento de bifidobacterias presentes en muestras fecales (MF) y en productos lácteos (PL).....   | <b>42</b>  |
| <b>Tabla 7.</b> Oligosacáridos de la leche humana.....   | <b>56</b>  |
| <b>Tabla 8.</b> Selección de criterios para las cepas probióticas.....   | <b>60</b>  |
| <b>Tabla 9.</b> Especies bacterianas empleadas como probióticos.....   | <b>61</b>  |
| <b>Tabla 10.</b> Efectos de probióticos descritos sobre el sistema digestivo.....  | <b>64</b>  |
| <b>Tabla 11.</b> Efectos de los probióticos sobre el sistema inmunitario.....  | <b>65</b>  |
| <b>Tabla 12.</b> Clasificación de los principales hidratos de carbono de la dieta.....   | <b>69</b>  |
| <b>Tabla 13.</b> Nombre y estructura química de los oligosacáridos (OS).....   | <b>71</b>  |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>  |            |
| <b>Tabla 14.</b> Ingredientes de Leche 2 de continuación y Leche 2 de continuación probiótica.....   | <b>98</b>  |
| <b>Tabla 15.</b> Bifidobacterias utilizadas para la evaluación de diferentes oligosacáridos.....   | <b>100</b> |
| <b>Tabla 16.</b> Substratos utilizados para el crecimiento de las bifidobacterias.....   | <b>100</b> |
| <b>Tabla 17.</b> Preparación e interpretación de la escala de MacFarland.....  | <b>103</b> |
| <b>Tabla 18.</b> Diseño del estudio de la viabilidad de las bifidobacterias añadidas a las fórmulas infantiles en función de la pauta de administración indicada por el fabricante.....  | <b>107</b> |
| <b>Tabla 19.</b> Alimentación de los bebés participantes en el estudio de la flora fecal infantil durante el primer año de vida.....   | <b>110</b> |
| <b>Tabla 20.</b> Condiciones de cultivo de los microorganismos investigados de la flora fecal infantil.....  | <b>111</b> |
| <b>Tabla 21.</b> Substratos incluidos en cada uno de los 50 pocillos de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas api 50 CH.....   | <b>112</b> |
| <b>Tabla 22.</b> Dietas empleadas en el estudio <i>in vivo</i> con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles la absorción mineral.....   | <b>114</b> |
| <b>Tabla 23.</b> Condiciones instrumentales establecidas para la determinación de los minerales (Ca, Mg y Fe) investigados.....  | <b>122</b> |
| <b>Tabla 24.</b> Cálculo de las concentraciones de los minerales (Ca, Mg y Fe) analizados en las diferentes muestras.....  | <b>123</b> |
| <b>Tabla 25.</b> Concentraciones de los patrones utilizados, ecuaciones de las rectas de calibrado y coeficientes de linealidad ( $R^2$ ) para las rectas patrón cada uno de los minerales determinados.....   | <b>123</b> |
| <b>Tabla 26.</b> Cálculo de las concentraciones de fósforo (P) analizado en las diferentes muestras.....   | <b>126</b> |
| <b>Tabla 27.</b> Composición nutricional de las dietas empleadas en el presente estudio de investigación.....  | <b>127</b> |
| <b>Tabla 28.</b> Medios de cultivo empleados en el recuento de las bifidobacterias y de flora total aerobia y anaerobia intestinal en ratas.....   | <b>137</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  |            |
| <b>Tabla 29.</b> Análisis de varianza del pH del medio de cultivo y del crecimiento de 4 especies de bifidobacterias (expresado en DO y log ufc/mL) utilizando como fuente de variación el sustrato, el tiempo de incubación y la interacción entre ambos..... | <b>145</b> |
| <b>Tabla 30.</b> Valores finales de crecimiento de bifidobacterias expresado como densidad óptica (DO) y de pH del caldo de cultivo obtenidos al 7º día de incubación.....   | <b>149</b> |
| <b>Tabla 31.</b> Análisis de varianza del recuento de bifidobacterias en las fórmulas infantiles durante el periodo de consumo por el lactante (6 y 14 días).....  | <b>154</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabla 32.</b> Análisis de varianza de los recuentos de la microbiota fecal infantil y del pH a lo largo del 1 <sup>er</sup> año de vida entre los grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica.....  | <b>158</b> |
| <b>Tabla 33.</b> Recuento microbiológico en muestras fecales infantiles a lo largo del 1 <sup>er</sup> año de vida.....  | <b>159</b> |
| <b>Tabla 34.</b> Valor de pH de las muestras fecales infantiles a lo largo del 1 <sup>er</sup> año de vida.....  | <b>160</b> |
| <b>Tabla 35.</b> Análisis de varianza de los recuentos de la microbiota fecal infantil a diferentes edades entre los grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica.....  | <b>161</b> |
| <b>Tabla 36.</b> Patrón de fermentación de las bifidobacterias aisladas de las muestras fecales infantiles mediante la galería api 50CH.....   | <b>164</b> |
| <b>Tabla 37.</b> Análisis de varianza de los parámetros peso final, ganancia de peso, ingestión de alimento y eficiencia alimentaria debido a las dietas objeto de estudio, y estudio del efecto del peso inicial de los animales en la variación de estos parámetros..... | <b>166</b> |
| <b>Tabla 38.</b> Crecimiento y eficiencia alimentaria.....   | <b>167</b> |
| <b>Tabla 39.</b> Medidas fisiológicas de las ratas.....  | <b>171</b> |
| <b>Tabla 40.</b> Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas alimentadas con diferentes dietas durante 30 días.....   | <b>173</b> |
| <b>Tabla 41.</b> Recuento microbiológico de aerobios, anaerobios y bifidobacterias en heces de ratas.....  | <b>175</b> |
| <b>Tabla 42.</b> Balance mineral del calcio.....   | <b>178</b> |
| <b>Tabla 43.</b> Balance mineral del magnesio.....   | <b>184</b> |
| <b>Tabla 44.</b> Balance mineral del fósforo.....  | <b>187</b> |
| <b>Tabla 45.</b> Balance mineral del hierro.....   | <b>191</b> |
| <b>Tabla 46.</b> Peso y pH del ciego y su contenido en ratas.....  | <b>192</b> |
| <b>Tabla 47.</b> Peso y pH del colon y su contenido en ratas.....  | <b>193</b> |
| <b>Tabla 48.</b> Distribución de los minerales en las fases líquida y sólida del contenido del ciego y del colon.....  | <b>197</b> |
| <b>Tabla 49.</b> Morfología de la mucosa del colon y del ciego de las ratas.....   | <b>200</b> |
| <b>Tabla 50.</b> Mineralización del fémur en ratas.....  | <b>202</b> |
| <b>Tabla 51.</b> Mineralización de la tibia en ratas.....  | <b>203</b> |
| <b>Tabla 52.</b> Estudio del efecto del peso inicial de los animales en la variación de los pesos de los órganos diana.....  | <b>204</b> |
| <b>Tabla 53.</b> Índices de correlación entre el pH del contenido del ciego y colon con los parámetros histológicos en la mucosa del ciego y colon.....  | <b>205</b> |
| <b>Tabla 54.</b> Coeficientes de correlación entre la absorción aparente mineral y los parámetros medidos en el intestino grueso.....  | <b>206</b> |
| <b>Tabla 55.</b> Coeficientes de correlación entre la retención mineral y los parámetros medidos en el intestino grueso.....   | <b>206</b> |
| <b>Tabla 56.</b> Estudio de correlación establecido entre el contenido mineral del fémur y los balances minerales y parámetros medidos en el intestino grueso.....   | <b>207</b> |
| <b>Tabla 57.</b> Estudio de correlación establecido entre el contenido mineral de la tibia y los balances minerales y parámetros medidos en el intestino grueso.....   | <b>208</b> |

## Índice de Figuras

|   |            |
|---|------------|
| <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>   |            |
| <b>Figura 1.</b> Distribución de las principales especies bacterianas en el aparato digestivo.....  | <b>43</b>  |
| <b>Figura 2.</b> Cambios de la flora intestinal desde el nacimiento hasta la vejez.....   | <b>46</b>  |
| <b>Figura 3.</b> Diferencias regionales en la función del intestino grueso humano.....  | <b>48</b>  |
| <b>Figura 4.</b> Esquema general de la fermentación por la flora bacteriana del colon.....  | <b>51</b>  |
| <b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la formación de AGCC en la fermentación de la bacterias del colon.....   | <b>52</b>  |
| <b>Figura 6.</b> Estructura típica de un oligosacárido.....   | <b>61</b>  |
| <b>Figura 7.</b> Esquema que representa los procesos de producción de los oligosacáridos (OS).....  | <b>72</b>  |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>   |            |
| <b>Figura 8.</b> Representación gráfica del diseño experimental del presente estudio de investigación.....  | <b>97</b>  |
| <b>Figura 9.</b> Estructura química de los componentes mayoritarios de los OND utilizados para el crecimiento selectivo de las bifidobacterias.....   | <b>99</b>  |
| <b>Figura 10. Diagrama</b> de flujo de la elaboración de Leche 2 de continuación y Leche 2 de continuación probiótica.....  | <b>101</b> |
| <b>Figura 11.</b> Representación de la recta de calibrado para la escala MacFarland.....  | <b>104</b> |
| <b>Figura 12.</b> Galería enzimática (metabolismo de hidratos de carbono) api 50 CHL para bacterias ácido-lácticas.....   | <b>113</b> |
| <b>Figura 13.</b> Representación de la recta de calibrado para el fósforo (P).....  | <b>125</b> |
| <b>Figura 14.</b> Diseño experimental del estudio <i>in vivo</i> con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral.....  | <b>130</b> |
| <b>Figura 15.</b> Metodología seguida en el estudio <i>in vivo</i> con ratas.....   | <b>131</b> |
| <b>Figura 16.</b> Imagen de las criptas epiteliales del colon proximal de ratas.....  | <b>142</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   |            |
| <b>Figura 17.</b> Gráficos de medias obtenidas para la interacción del tiempo de incubación con el sustrato, donde se muestra el crecimiento de las bifidobacterias ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> ) mediante la medición de cambios en la DO y log ufc/mL.....                       | <b>147</b> |
| <b>Figura 18</b> Gráficos de medias obtenidas para la interacción del tiempo de incubación con el sustrato, donde se muestran los cambios de pH en el caldo TPY (glucosa, FOS cc, inulina, oligofruktosa y 4'-GOS) incubado con bifidobacterias ( <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> )..... | <b>148</b> |
| <b>Figura 19.</b> Viabilidad de las bifidobacterias añadidas a la fórmula infantil durante el periodo de consumo del bote (6 días) y humedad de la fórmula durante dicho periodo.....   | <b>154</b> |
| <b>Figura 20.</b> Viabilidad de las bifidobacterias añadidas a la fórmula infantil durante el periodo de consumo del bote (14 días) y humedad de la fórmula durante dicho periodo.....  | <b>155</b> |
| <b>Figura 21.</b> Recuento de bifidobacterias en bs grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica durante el 1 <sup>er</sup> año de vida.....   | <b>162</b> |
| <b>Figura 22.</b> pH de las heces infantiles en los grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica durante el 1 <sup>er</sup> año de vida.....   | <b>162</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 23.</b> Representación gráfica de la relación lineal entre la absorción de Ca y la altura de las criptas del colon distal.....   | <b>209</b> |
| <b>Figura 24.</b> Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Mg, la densidad celular del colon distal y la altura de las criptas del colon proximal..... | <b>210</b> |
| <b>Figura 25.</b> Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Mg, la densidad celular del colon distal y el pH del contenido del ciego.....               | <b>211</b> |
| <b>Figura 26.</b> Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Mg, el pH del contenido del ciego y del colon.....  | <b>212</b> |
| <b>Figura 27.</b> Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Fe, el pH del contenido del colon y la altura de las criptas del colon proximal.....        | <b>214</b> |
| <b>Figura 28.</b> Análisis de componentes principales (ACP) para el calcio.....  | <b>216</b> |
| <b>Figura 29.</b> Análisis de componentes principales (ACP) para el magnesio.....  | <b>217</b> |
| <b>Figura 30.</b> Análisis de componentes principales (ACP) para el fósforo.....   | <b>218</b> |
| <b>Figura 31.</b> Análisis de componentes principales (ACP) para el hierro.....  | <b>219</b> |

## ABREVIATURAS

|                             |   |  |                                     |
|-----------------------------|---|--|-------------------------------------|
| <b>%</b> .....              | Porcentaje  | <b>h</b> .....                           | Hora                                |
| <b>±</b> .....              | Más menos   | <b>H<sub>2</sub></b> .....               | Hidrógeno                           |
| <b>mg</b> .....             | Microgramos   | <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> .....  | Peróxido de hidrógeno               |
| <b>mL</b> .....             | Microlitros   | <b>H<sub>2</sub>S</b> .....              | Ácido sulfhídrico                   |
| <b>aa</b> .....             | Aminoácidos   | <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> ..... | Ácido sulfúrico                     |
| <b>AA</b> .....             | Absorción aparente  | <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b> ..... | Ácido bórico                        |
| <b>AAP</b> .....            | American Academy of Pediatrics                                | <b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b> ..... | Ácido fosfórico                     |
| <b>Abs</b> .....            | Absorbancia   | <b>Hb</b> .....                          | Hemoglobina                         |
| <b>ACP</b> .....            | Análisis de Componentes Principales                           | <b>HCl</b> .....                         | Ácido clorhídrico                   |
| <b>ADN</b> .....            | Ácido Desoxirribonucleico                                     | <b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> ..... | Bicarbonato                         |
| <b>ADP</b> .....            | Adenosin-difosfato  | <b>HDL</b> .....                         | Lipoproteínas de alta densidad      |
| <b>AG</b> .....             | Ácidos Grasos   | <b>HNO<sub>3</sub></b> .....             | Ácido nítrico                       |
| <b>AGCC</b> .....           | Ácidos Grasos de Cadena Corta                                 | <b>Ht</b> .....                          | Hematocrito                         |
| <b>AGCR</b> .....           | Ácidos Grasos de Cadena Ramificada                            | <b>ID</b> .....                          | Intestino delgado                   |
| <b>AMP</b> .....            | Adenosin Monofosfato  | <b>Ig</b> .....                          | Inmunoglobulina                     |
| <b>ANOVA</b> .....          | Análisis de Varianza unifactorial                             | <b>IOS</b> .....                         | Isomaltooligosacáridos              |
| <b>AOAC</b> .....           | Association of Official Analytical Chemist                    | <b>K</b> .....                           | Potasio                             |
| <b>APTG</b> .....           | Agua de Peptona Tamponada y Glucosada                         | <b>kcal</b> .....                        | Kilocalorías                        |
| <b>ARN</b> .....            | Ácido ribonucleico  | <b>k-Da</b> .....                        | Kilodaltons                         |
| <b>ARNr</b> .....           | Ácido ribonucleico ribosomal                                  | <b>kg</b> .....                          | Kilogramos                          |
| <b>ATP</b> .....            | Adenosin-Trifosfato   | <b>kJ</b> .....                          | Kilojulios                          |
| <b>BAL</b> .....            | Bacterias Ácido Lácticas                                      | <b>L</b> .....                           | Litros                              |
| <b>BBE</b> .....            | Bacteroides Bilis Esculina                                    | <b>LaCl<sub>3</sub></b> .....            | Cloruro de lantano                  |
| <b>Ca</b> .....             | Calcio  | <b>LDL</b> .....                         | Lipoproteínas de baja densidad      |
| <b>CBA</b> .....            | Columbia Base Agar  | <b>Log</b> .....                         | Logaritmo decimal                   |
| <b>CECT</b> .....           | Colección Española de Cultivos Tipo                           | <b>LSRO</b> .....                        | Life Sciences Research Office       |
| <b>CH<sub>4</sub></b> ..... | Metano  | <b>M</b> .....                           | Molaridad                           |
| <b>Cl</b> .....             | Cloro   | <b>Mb</b> .....                          | Mioglobina                          |
| <b>cm</b> .....             | Centímetros   | <b>mEq</b> .....                         | Miliequivalentes                    |
| <b>CO<sub>2</sub></b> ..... | Dióxido de carbono  | <b>Mg</b> .....                          | Magnesio                            |
| <b>COL</b> .....            | Colesterol  | <b>mg</b> .....                          | Miligramos                          |
| <b>col</b> .....            | Colaboradores   | <b>Min</b> .....                         | Minutos                             |
| <b>Cu</b> .....             | Cobre   | <b>mL</b> .....                          | Mililitros                          |
| <b>DO</b> .....             | Densidad Óptica   | <b>mm</b> .....                          | Milímetros                          |
| <b>DT</b> .....             | Disacáridos Transgalactosilados                               | <b>MOS</b> .....                         | Maltooligosacáridos                 |
| <b>EAA</b> .....            | Espectrofotometría de Absorción Atómica                       | <b>N</b> .....                           | Nitrógeno                           |
| <b>ESPGAN</b> .....         | European Society of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition | <b>Na</b> .....                          | Sodio                               |
| <b>F6PPK</b> .....          | Fructosa 6-Fosfato Fosfocetolasa                              | <b>NaCl</b> .....                        | Cloruro sódico                      |
| <b>FAO</b> .....            | Food and Agriculture Organization of the United Nations       | <b>NaOH</b> .....                        | Hidróxido sódico                    |
| <b>FD</b> .....             | Fibra Dietética   | <b>NCR</b> .....                         | National Council Research           |
| <b>FDA</b> .....            | Food and Drug Administration                                  | <b>NH<sub>3</sub></b> .....              | Amoníaco                            |
| <b>Fe</b> .....             | Hierro  | <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> .....  | Amonio                              |
| <b>FL</b> .....             | Fase Líquida  | <b>nm</b> .....                          | Nanómetros                          |
| <b>FOS cc</b> .....         | Fructooligosacáridos de Cadena Corta                          | <b>Nº</b> .....                          | Número                              |
| <b>FOS</b> .....            | Fructooligosacáridos  | <b>NS</b> .....                          | No Significativo                    |
| <b>FOSHU</b> .....          | Foods for Specified Health Use                                | <b>O<sub>2</sub></b> .....               | Oxígeno                             |
| <b>FS</b> .....             | Fase Sólida   | <b>°C</b> .....                          | Grado centígrado                    |
| <b>g</b> .....              | Gramos  | <b>OMS</b> .....                         | Organización Mundial de la Salud    |
| <b>G+C</b> .....            | Guanina más citosina  | <b>OND</b> .....                         | Oligosacáridos no digeribles        |
| <b>GES</b> .....            | Gentiligosacáridos  | <b>OS</b> .....                          | Oligosacáridos                      |
| <b>GI</b> .....             | Gastrointestinal  | <b>P</b> .....                           | Fósforo                             |
| <b>GLDH</b> .....           | Glutamato deshidrogenasa                                      | <b>p</b> .....                           | Nivel de significación estadístico  |
| <b>GOS</b> .....            | Galactooligosacáridos   | <b>Pa</b> .....                          | Para análisis                       |
| <b>GP</b> .....             | Grado de Polimerización                                       | <b>PCR</b> .....                         | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| <b>GRAS</b> .....           | Generally Recognized As Safe                                  | <b>Pf</b> .....                          | Peso fresco                         |
| <b>GUS</b> .....            | Glucooligosacáridos   | <b>Pi</b> .....                          | Fósforo inorgánico                  |

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>Pm</b> .....            | Peso molecular                              |
| <b>POS</b> .....           | Palatinosaoligosacáridos                    |
| <b>p/p</b> .....           | Peso/peso                                   |
| <b>Ppm</b> .....           | Partes por millón                           |
| <b>PS</b> .....            | Polisacáridos                               |
| <b>Ps</b> .....            | Peso seco                                   |
| <b>p/v</b> .....           | Peso/volumen                                |
| <b>r</b> .....             | Coefficiente de correlación                 |
| <b>R<sup>2</sup></b> ..... | Coefficiente de linealidad                  |
| <b>RB</b> .....            | Rafinosa Bifidobacterium                    |
| <b>RDR</b> .....           | Raciones Dietéticas Recomendadas            |
| <b>RGR</b> .....           | Recuento de Glóbulos Rojos                  |
| <b>rpm</b> .....           | Revoluciones por minuto                     |
| <b>RPS</b> .....           | Solución de Péptona Fisiológica<br>Reducida |
| <b>SCF</b> .....           | Scientific Committee on Food                |
| <b>Seg</b> .....           | Segundos                                    |
| <b>Sem</b> .....           | Semanas                                     |
| <b>SOS</b> .....           | Sojaoligosacáridos                          |
| <b>SSF</b> .....           | Solución Salina Fisiológica                 |
| <b>TG</b> .....            | Triglicéridos                               |
| <b>TIBC</b> .....          | Capacidad total de fijación del hierro      |
| <b>TOS</b> .....           | Transgalactooligosacáridos                  |
| <b>TSC</b> .....           | Triptosa Sulfito Cicloserina                |
| <b>ufc</b> .....           | Unidades formadoras de colonias             |
| <b>UI</b> .....            | Unidades Internacionales                    |
| <b>v/v</b> .....           | Volumen/volumen                             |
| <b>VLDL</b> .....          | Lipoproteínas de muy baja densidad          |
| <b>x g</b> .....           | Fuerza de la gravedad                       |
| <b>XOS</b> .....           | Xilooligosacáridos                          |
| <b>4'-GOS</b> .....        | 4'-Galactosil-lactosa                       |
| <b>6'-GOS</b> .....        | 6'-Galactosil-lactosa                       |
| <b>Zn</b> .....            | Zinc  |

## **INTRODUCCIÓN**

Hay muy buenas razones para estudiar la nutrición y el crecimiento durante la infancia, puesto que es el periodo de la vida donde la velocidad de crecimiento y las demandas nutricionales son mayores. Los niños triplican el peso e incrementan su longitud en un 50% durante el primer año. De hecho, este proceso se hace más evidente durante el primer mes de vida, cuando el crecimiento es especialmente rápido, ya que ganan unos 200 g de peso e incrementan su longitud en 1 cm cada semana. Paralelamente, los órganos crecen y maduran a un ritmo elevado. Estudios con animales han demostrado que deficiencias en la dieta durante los periodos sensibles a edades tempranas pueden tener consecuencias metabólicas a largo plazo (Sultan y Barker, 1994), especialmente sobre el desarrollo del individuo, pudiendo ser origen de ciertas enfermedades (Lucas y col., 1990).

La alimentación a pecho tiene un papel muy especial en la alimentación de los bebés y se considera superior a la alimentación con fórmula desde el punto de vista cualitativo (Standing Committee on Nutrition of the British Paediatric Association, 1994). Es la alimentación natural durante la primera infancia la más importante desde el punto de vista nutricional. Sin embargo, y aunque dos terceras partes de los niños sanos del todo el mundo son inicialmente alimentados a pecho, ésta cantidad se reduce considerablemente durante el periodo de lactancia. Consecuentemente, una gran población de niños sanos es alimentada con lactancia artificial mediante el uso de fórmulas infantiles comerciales. Esto crea el reto de proporcionar los nutrientes y otros factores bioactivos que estimulen el desarrollo de una microbiota que promueva el desarrollo gastrointestinal y la salud. Este desafío es mayor cuando se consideran casos de cuidados críticos, tales como niños que nacen de forma prematura y otros niños que requieren una nutrición entérica o parenteral. Claramente, la nutrición infantil proporciona una razón muy importante y práctica para el entendimiento del desarrollo ecológico del intestino del neonato (Gaskins y Lien, 1999).

Aunque la alimentación a pecho es considerada hoy en día como el método natural y preferible para alimentar a los niños, no siempre se ha pensado así. En el año 1500 las mujeres aristócratas de Inglaterra pensaban que amamantar a un niño era un inconveniente y que envejecía a las madres de forma prematura. Por tanto, se llegó a establecer que la alimentación a pecho debía ser realizada por parte de madres sustitutas. Las mujeres de clase alta de cualquier parte del mundo a menudo tenían de 12 a 20 niños, incluso 30 no era inusual, y el empleo de amas de cría era la única alternativa segura y responsable (Udall y Kilbourne, 1988).

La tecnología moderna introdujo un cambio en la alimentación infantil, la fórmula basada en la leche de vaca. El desarrollo de esta fórmula fue promovido por el descubrimiento de la pasteurización de la leche y la mejora de la digestibilidad de la leche de vaca tras el tratamiento térmico. La primera fórmula basada en leche de vaca se comercializó en 1867 por el químico alemán Von Liebig. El éxito comercial de ésta fórmula engendró un producto sustituto de la leche humana entre finales del siglo XIX y principios del XX. Esta fórmula podría

ser dividida en líneas generales en tres tipos: leche de vaca desecada combinada con un cereal azucarado, alguna forma de hidrato de carbono malteado y cereales usados con leche de vaca fresca (Anderson y col., 1982). Como los requerimientos nutricionales del niño fueron estimados durante las décadas siguientes, el valor nutricional de la "fórmula humanizada" mejorada y su composición empezaron a imitar con detalle la composición de la leche humana.

La producción y distribución de la fórmula infantil se ha convertido en un propósito complejo durante el siglo XX. Ello comprende el conocimiento de los requerimientos nutricionales y la fisiología de la digestión y absorción de nutrientes, la tecnología de la producción de fórmulas y la economía de producir fórmulas infantiles nutritivas y saludables a un precio razonable. Hoy en día se sabe que la dieta, entre otros factores ambientales y genéticos, tiene un importante papel sobre el estado de salud y de enfermedad del individuo. También hay una evidencia cada vez más creciente de que la microbiota del colon humano puede contribuir de forma positiva sobre la nutrición y salud del hospedador. Así pues, la capacidad de modular la dieta ha sido propuesta como un factor importante para mejorar la salud del intestino humano, especialmente durante un periodo de vida tan sensible como la infancia (Mountzouris y col., 2002).

Numerosos autores han descrito la existencia de diferencias en la composición de la microflora del intestino y en la incidencia de infecciones entre los bebés alimentados con lactancia materna y lactancia artificial. Aunque el desarrollo de fórmulas infantiles ha avanzado mucho desde el inicio de su comercialización, hay determinados componentes de la leche humana que no pueden ser duplicados en la fórmula infantil y que podrían posiblemente ser la causa de estas diferencias. Sin embargo, existen varios ingredientes alimenticios funcionales como los oligosacáridos, prebióticos, proteínas y probióticos que sí pueden ser añadidos a las fórmulas infantiles y que podrían modificar beneficiosamente la composición y las actividades de la microflora de los niños (Gibson y Roberfroid, 1995).

## **OBJETIVOS**

Los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral han sido:

- 1.-** Evaluar el crecimiento *in vitro* de diversas especies de bifidobacterias con diferentes oligosacáridos no digeribles como sustratos, con el fin de seleccionar el más adecuado para una posible utilización como prebiótico en fórmulas infantiles.
- 2.-** Estudiar la viabilidad de las bifidobacterias presentes en una fórmula infantil durante el periodo de consumo de la misma.
- 3.-** Evaluar el efecto del consumo de una fórmula infantil probiótica sobre la flora fecal infantil durante el primer año de vida.
- 4.-** Conocer el efecto que tiene la administración de siete dietas compuestas por fórmulas infantiles enriquecidas con bifidobacterias y/o galactooligosacáridos sobre la biodisponibilidad *in vivo* de calcio, magnesio, fósforo y hierro, con ratas Sprague-Dawley recién destetadas mediante un balance mineral.
- 5.-** Determinar la influencia de los probióticos y prebióticos añadidos a fórmulas infantiles sobre el epitelio intestinal de ciego y colon de ratas.
- 6.-** Determinar la influencia de los probióticos y prebióticos añadidos a fórmulas infantiles en la absorción de calcio, magnesio, fósforo y hierro en el ciego y colon de ratas.
- 7.-** Determinar la influencia de los probióticos y prebióticos añadidos a fórmulas infantiles en el depósito de calcio, magnesio, fósforo y hierro en el fémur y tibia de ratas.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1. LA ALIMENTACIÓN INFANTIL**

#### **1.1. Recuerdo histórico**

Hasta comienzos del siglo XX la lactancia materna se prolongaba hasta los dos años de edad e incluso más tarde, y en ocasiones se enriquecía mediante la administración de cereales y algunas semillas. Sin embargo, es a partir del momento del destete cuando la alimentación ha estado y está en dependencia del contexto sociocultural de cada país (Sánchez y Olivera, 1990), aunque durante el siglo XX ha sufrido un gran número de modificaciones con los objetivos de cubrir las necesidades de mantenimiento y asegurar la energía y nutrientes que exige el crecimiento, evitando tanto los excesos como las carencias nutritivas (Cervera y col., 1993). Fue la revolución industrial, con la incorporación de la mujer al trabajo, la que causó una disminución en la lactancia materna. La sustitución de ésta por productos heterólogos condujo a un aumento paralelo de la mortalidad infantil. A finales del siglo XIX se comenzaron a utilizar preparados como el "babeurre" (alimento de origen holandés), que consistía en una leche fermentada y parcialmente desengrasada. Fue el inicio de lo que podría llamarse la era científica de la alimentación infantil. Más tarde, durante la primera guerra mundial, comenzaron a prepararse leches albuminosas obtenidas a partir de caseinatos y "babeurre" (Sánchez y Olivera, 1990).

Sin embargo hasta 1941 no aparecieron las leches acidificadas, propuestas por Marriot, seguidas más tarde de las leches humanizadas o maternizadas. Posteriormente a partir de 1977 este término se sustituyó por el de "fórmulas adaptadas", una vez que el Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica (ESPGAN) estableció las normas para su composición.

#### **1.2. Maduración morfológica y funcional del tubo digestivo del niño**

Al nacimiento, la diferencia anatómica más llamativa con el individuo adulto en el sistema digestivo es la ausencia de dientes, que no aparecen hasta el 5º-6º mes, lo que indica que antes de esta fecha el niño sólo está preparado para recibir alimentos líquidos que no necesitan masticación (Herbst, 1995).

Entre las diferencias funcionales que existen en el lactante y el adulto, hay que destacar la falta de madurez de la actividad motora del estómago que facilita un vaciamiento rápido del estómago. La actividad peristáltica comienza en las etapas finales del desarrollo fetal y se completa en el 8º mes de embarazo, en consecuencia el prematuro tiene una actividad peristáltica incompletamente coordinada y menos eficiente que el bebé nacido a término (Hernández Rodríguez, 1999).

En los neonatos, aunque que el grado desarrollo de la mucosa y de las glándulas gástricas no se ha completado, su maduración es mayor que la de la musculatura, que es todavía deficiente. El factor intrínseco es el que madura más deprisa, alcanzándose valores normales a partir del tercer mes. En cambio, tanto la secreción de ácido clorhídrico (ác. clorhídrico) como de pepsina, solamente son similares a los del adulto a partir de los dos años. Este menor grado de acidez, condiciona una insuficiente digestión gástrica de las proteínas, que durante las primeras semanas es más acentuada y facilita la absorción de proteínas intactas (Chevalier, 1997). Sin embargo, el ác. clorhídrico secretado por dichas glándulas es suficiente para que se aumente la formación de complejos solubles de hierro (Fe), facilitando la absorción intestinal de este elemento. La pepsina coagula la leche e inicia la hidrólisis de la caseína, a la que desdobra en albumosas y polipéptidos, que a su vez son potentes estímulos para la secreción gástrica y pancreática, pero no intervienen sobre la lactoalbúmina ni sobre la lactoglobulina. El bajo nivel de producción de ácido y pépsinógeno por el estómago en las primeras etapas de la vida, puede ser importante para que no se inactiven las inmunoglobulinas (Ig) ingeridas con la leche materna y para que los antígenos sean reconocidos en el tubo digestivo favoreciendo el desarrollo inmunitario. La lipólisis gástrica representa el 10-30% y puede compensar los bajos niveles de lipasa pancreática en el recién nacido. Las concentraciones de gastrina circulante son muy altas en el periodo neonatal, lo que probablemente contribuya a la maduración de la función gastrointestinal (GI) y participe en la aceleración del crecimiento de la mucosa (Molina y Maldonado, 1993).

En general se puede afirmar, que el intestino del recién nacido puede absorber todas las sustancias que necesitan hidrólisis en la membrana (oligopéptidos, oligo y disacáridos) así como las que son transferidas directamente: mono, di y tripéptidos, aminoácidos (aa) y monosacáridos. Por el contrario, la enteroquinasa, enzima importante para la digestión proteica, es deficitaria en los primeros meses y no alcanza valores de adulto hasta los cuatro años (Chevalier, 1997).

En los primeros estadios de la lactancia el 50% de la amilasa intraduodenal es de origen salival, su maduración espontánea se completa entre el segundo y tercer año. Su producción es muy escasa por la carencia de almidón en la dieta; sin embargo la leche humana y especialmente el calostro compensan esta deficiencia ya que son ricos en esta enzima, y en el intestino hay glucoamilasa responsable de la hidrólisis de los polímeros de glucosa (Molina y Maldonado, 1993).

Las enzimas proteolíticas y lipolíticas aparecen precozmente en la vida fetal, pero su desarrollo no se ha completado al nacimiento. El jugo pancreático está compuesto fundamentalmente de diferentes proteasas como la tripsina I y II, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa A y B y fosfolipasa A, que intervienen en la hidrólisis de las proteínas dando lugar a aa y oligopéptidos. Estas enzimas tienen una actividad escasa durante las primeras semanas, debido no sólo a la inmadurez pancreática sino también a la deficiente secreción de

enteroquinasa y a una respuesta deficiente a la pancreozimina-colecistoquinina (Hernández Rodríguez, 1999).

Respecto a la actividad lipolítica, la lipasa pancreática para poder actuar sobre los triglicéridos (TG) de cadena larga precisa de la emulsión previa de las grasas por medio de los ácidos biliares y de la presencia de colipasa, que se segrega paralelamente a la lipasa a partir del primer año, y que es más activa sobre los substratos insolubles emulsionados. En el anterior proceso también interviene la esterasa carboxilasa pancreática, de mayor acción sobre los substratos micelares o solubles. Ambas tienen una actividad reducida en los recién nacidos y sobre todo en los prematuros, alcanzando valores semejantes a los de los adultos hacia los seis meses de vida (Molina y Maldonado, 1993; Hernández Rodríguez, 1999).

En el jugo intestinal, tiene gran interés la existencia de disacaridasas, que situadas en el borde en cepillo de las vellosidades intestinales completan la hidrólisis de los azúcares: la lactasa actúa sobre la lactosa, la sacarasa sobre la sacarosa y la maltasa sobre la maltosa. En las células intestinales existen además oligopeptidasas para hidrolizar péptidos de bajo peso molecular, especialmente dipéptidos, en sus aa constituyentes, y también lipasas que hidrolizan los monoglicéridos absorbidos (Molina y Maldonado, 1993).

Los ácidos biliares intervienen en la digestión intraluminal emulsionando las grasas, favoreciendo así la acción de la lipasa y sobre todo solubilizan los ácidos grasos (AG) de cadena larga, los monoglicéridos, el colesterol (COL) y las vitaminas liposolubles. En el intestino parte de estos ácidos biliares conjugados son deconjugados por la flora bacteriana y algunos además pierden hidroxilos y forman el ácido deoxicólico. El 90% de estos ácidos son absorbidos de nuevo en el íleon terminal y por vía porta llegan al hígado donde son de nuevo conjugados con glicina o taurina (circulación entero-hepática). En el recién nacido existe una inmadurez de esta circulación entero-hepática debido a diversos factores y como consecuencia, la digestión de la grasa en el neonato es difícil. La absorción intestinal tiene lugar en todo el intestino delgado (ID), preferentemente en su porción terminal (Molina y Maldonado, 1993).

En el intestino grueso se absorbe gran cantidad de agua y sales biliares y se forman jabones. Se producen fenómenos fermentativos sobre los restos de hidratos de carbono no absorbidos, y de putrefacción sobre los restos de las proteínas no absorbidas en tramos superiores, que originan distintos gases: indol, escatol, amoníaco (NH<sub>3</sub>), etc. La motilidad del colon consiste fundamentalmente en movimientos de segmentación, el flujo es lento y potentes contracciones peristálticas desplazan las heces hacia el recto. El principal estímulo fisiológico de la motilidad del colon parece ser la ingestión de alimentos y probablemente está mediada por sustancias colinérgicas y encefalinas (Molina y Maldonado, 1993).

### **1.3. Alimentación en la primera infancia**

La infancia constituye probablemente el período de vida con una mayor demanda nutricional, pues el peso corporal del niño se duplica entre el 4º y el 6º mes de vida y se triplica

al finalizar el año (Milner, 1990). Por ello, los niños, desde un punto de vista dietético, constituyen uno de los segmentos más vulnerables de nuestra sociedad. La investigación debe orientarse hacia una mejora de la salud y la calidad de vida de los niños, no sólo para la obtención de unos beneficios inmediatos sino para conseguirles una nutrición óptima (Splett y Story, 1991). Las decisiones con respecto a la alimentación del niño durante el primer año de vida suponen una oportunidad única e irrecuperable para alcanzar un crecimiento y desarrollo óptimo y una larga vida saludable (Johnson, 1997).

Según Bueno y Pérez (1986) y Tojo y col. (1987a), la alimentación que recibe el niño desde el nacimiento hasta el 2º año de edad se puede dividir en tres períodos:

- 1- Período lácteo: se extiende desde el nacimiento hasta aproximadamente los cuatro y seis meses de edad. Al nacer el lactante presenta los reflejos de succión y deglución, pero aún no ha desarrollado la capacidad de digerir ciertas proteínas o de soportar cargas osmolares excesivas a nivel renal, siendo la leche el único alimento que puede tomar el niño (Casado de Frías y col., 1993). El alimento unánimemente reconocido como ideal durante este período de la vida es la leche materna. No obstante, en ocasiones la madre no puede alimentar al niño con la leche especialmente diseñada para él por la naturaleza. En estos casos la leche de vaca modificada, en preparaciones denominadas "fórmula adaptada" puede ser un buen alimento sustitutivo, puesto que trata de aproximarse al máximo a la composición de la leche materna (Martínez y Hernández, 1993).
- 2- Período de transición o diversificación progresiva: este período está comprendido desde los seis meses al año de edad. Es la fase de introducción paulatina de alimentos no lácteos, de tal forma que no se altere el ritmo de maduración digestiva, renal y el desarrollo neuromuscular. Además, en esta fase el niño va a empezar a conocer los alimentos, a masticar y a distinguir las características organolépticas de los mismos (Cervera y col., 1993). La alimentación complementaria está representada principalmente por alimentos homogeneizados, granulados en pequeñas partículas que no son precisos masticar, o bien con una textura más gruesa y con mayores partículas para estimular la masticación del niño antes de tragar (FAO/OMS, 1989).
- 3- Período de maduración digestiva: comprende desde el 1º hasta el 2º año de edad. Se produce una maduración fisiológica e inmunitaria que permitirá llegar a una diversificación completa de la alimentación. Los alimentos que se pueden administrar en esta fase son los mismos que en el adulto, aunque modificados en cuanto a su textura y condimentación (Cervera y col., 1993).

Pocas veces en la vida la dieta es tan monótona y tan continuada en el tiempo como en los primeros meses de vida. Así, el consumo de leche materna o de fórmula cinco ó seis veces al día durante cuatro, cinco o seis meses satisface las necesidades nutritivas del lactante, pero prolongar este tipo de alimentación puede dar lugar a una disminución de algún nutriente, ya que a partir de los cuatro meses los requerimientos de nutrientes se ven cada vez menos cubiertos por una alimentación exclusivamente formada por leche (Lönnnerdal, 1989).

La leche humana y la leche de vaca en la alimentación del lactante. La leche humana es el alimento ideal durante los cuatro ó seis primeros meses, ya que cubre todas las necesidades nutritivas del lactante y evita riesgos innecesarios. Sin embargo, en situaciones de alteraciones anatómicas o graves enfermedades que entrañen un riesgo para la madre o el niño está indicada la lactancia artificial. En estos casos, el empleo de leches industriales destinadas al lactante elaboradas a partir de leche de vaca constituyen un sustituto adecuado, pero debido a que son sensiblemente diferentes a la leche materna, es necesario modificarlas para hacerlas similares al modelo humano (Tojo y col., 1995).

Las diferencias existentes entre ambos tipos de leche, humana y de vaca, afectan a casi todos sus componentes (Tabla 1). La leche humana experimenta variaciones en el curso de la lactación y alguno de sus componentes está influenciado por la alimentación materna y en menor grado por el estado nutritivo de la madre (Butte y col., 1984; Nommsen y col., 1991).

La leche humana tiene un menor contenido proteico y mineral que la leche de vaca debido a la menor velocidad de crecimiento del recién nacido humano. La relación albúmina/caseína, mayor en la leche humana, tiene como consecuencia una mejor digestibilidad de la leche, ya que la caseína produce una masa de cuajo mal digerido en el estómago del lactante. Así mismo, la leche materna tiene un contenido llamativamente superior en nitrógeno no proteico que la de vaca debido a una mayor presencia de nucleósidos y nucleótidos, sustancias de especial importancia en la maduración del intestino y desarrollo inmunitario (Kunz y Lönnnerdal, 1992; Blanco y Tellería, 1995). La leche de vaca tiene un contenido muy escaso de AG esenciales, una cantidad menor de AG monoinsaturados (oleico y palmitoleico) y la estructura de los TG también es diferente. Esto hace que el coeficiente de absorción de las grasas de la leche de vaca sea menor del 60% en la primera semana y menor del 90% en etapas posteriores, mientras que en la leche humana es siempre mayor del 90%. El mayor contenido de COL de la leche humana hace que los niños alimentados al pecho tengan unas cifras de colesterolemia superiores a las de los niños que reciben fórmulas (Van Biervliet y col., 1992). La leche humana tiene un contenido mayor en lactosa para mantener el equilibrio osmótico y hacerla isotónica con el plasma sin aumentar el contenido en sales minerales; además tiene otros hidratos de carbono que apenas existen en la de vaca.

**Tabla 1.** Composición de la leche humana y de la leche de vaca

| <b>Composición</b>                        | <b>Leche humana</b> | <b>Leche de vaca</b> |
|---|---------------------|----------------------|
| <b>Energía</b> (kcal/100 mL)              | 62-70               | 68                   |
| <b>Proteínas</b> (g/100 mL)               | 0,89-1,1            | 3,5                  |
| Caseína (%)                               | 40                  | 82                   |
| Proteínas del suero (%)                   | 60                  | 18                   |
| Nitrógeno no proteico (%)                 | 15-25               | 6                    |
| <b>Grasas</b> (g/100 mL)                  | 3,5-4               | 3,7                  |
| Ác. linoleico (%)                         | 7-14                | 2,2-2,3              |
| Colesterol (mg/100 mL)                    | 20-25               | 10-15                |
| <b>Hidratos de carbono</b> (g/100 mL)     | 7,7                 | 6,1                  |
| Lactosa (g/100 mL)                        | 6-6,5               | 5                    |
| Oligosacáridos y glicopéptidos (g/100 mL) | 1-1,2               | 0,1                  |
| <b>Minerales</b>                          |                     |                      |
| Calcio (mg/L)                             | 340                 | 1.200                |
| Fósforo (mg/L)                            | 140                 | 920                  |
| Sodio (mEq/L)                             | 7                   | 22                   |
| Potasio (mEq/L)                           | 13                  | 35                   |
| Cloruro (mEq/L)                           | 11                  | 29                   |
| Magnesio (mg/L)                           | 30                  | 120                  |
| Azufre (mg/L)                             | 140                 | 300                  |
| Cromo (µg/L)                              | 0,3                 | 8-13                 |
| Manganeso (µg/L)                          | 3-7                 | 20-40                |
| Cobre (µg/L)                              | 350                 | 300                  |
| Zinc (mg/L)                               | 2,4-3,5             | 3-5                  |
| Yodo (µg/L)                               | 30                  | 47                   |
| Selenio (µg/L)                            | 13-50               | 5-50                 |
| Hierro (mg/L)                             | 0,3-0,5             | 0,4                  |
| <b>Vitaminas</b>                          |                     |                      |
| Tiamina (µg/L)                            | 160                 | 440                  |
| Rivoflabina (µg/L)                        | 360                 | 1.750                |
| Niacina (µg/L)                            | 1.470               | 940                  |
| Piridoxina (µg/L)                         | 100                 | 640                  |
| Pantotenato (mg/L)                        | 1,8                 | 3,46                 |
| Folacina (µg/L)                           | 52                  | 55                   |
| Cianocobalamina (µg/L)                    | 0,3                 | 4                    |
| Vitamina A (UI/L)                         | 1.898               | 1.025                |
| Vitamina C (mg/L)                         | 43                  | 11                   |
| Vitamina D (UI/L)                         | 22                  | 14                   |
| Vitamina E (mg/L)                         | 1,8                 | 0,4                  |
| Vitamina K (mg/L)                         | 15                  | 60                   |

Adaptado de Hernández Rodríguez (1999)

Existe una gran confusión semántica respecto a la denominación de los preparados para lactantes (ESPGAN, 1990). La denominación de fórmula o fórmula infantil sirve para designar a todos los productos destinados a la alimentación del lactante, que pueden sustituir completa o parcialmente a la leche materna. Dentro de aquellas, los Comités Europeos de Expertos en Nutrición (ESPGAN, CCE) han considerado conveniente proponer dos tipos de fórmula, una denominada *fórmula de inicio*, para los primeros seis meses, y otra denominada *fórmula de continuación*, para utilizarla a partir de esa edad (ESPGAN, 1990; Commission of the European Communities, 1991). El Comité de Nutrición de la Asociación Americana de Pediatría en cambio considera que la diferencia de los requerimientos nutricionales no justifica la

existencia de dos fórmulas distintas y propone un único producto denominado *fórmula infantil* (Committee on Nutrition, 1989).

Sin embargo, en 1991 el Consejo de las Comunidades Europeas publicó una Directiva relativa a los productos utilizados para la alimentación de los lactantes (Commission of the European Communities, 1991) basada en los informes técnicos de la ESPGAN, del Codex Alimentarius, de la AAP (American Academy of Pediatrics), y del Comité Científico para la alimentación humana (Scientific Committee on Food, SFC) de la propia Unión Europea (*Directiva de la Comisión de 14 de mayo 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación*). Las innovaciones más significativas son el cambio de nombre de *fórmula de inicio* por el de *preparado para lactantes* y el de *fórmula de continuación* por el de *preparado de continuación*. Además, cuando los preparados sean elaborados exclusivamente a partir de proteínas procedentes de leche de vaca, pueden denominarse *leche para lactantes* y *leche de continuación* respectivamente.

Otro aspecto importante de la Directiva es que con el fin de aproximar y regular los aspectos nutricionales de estos preparados en los países de la Unión Europea, se estableció que fueran autorizados para su comercialización a partir de diciembre de 1992 los preparados que se ajustarán a ella y prohibidos los que no la cumplieran a partir del 1 de junio de 1994 (Commission of the European Communities, 1991). A continuación se detallan brevemente en que consisten estos preparados.

Fórmulas de inicio o preparados para lactantes. Este tipo de fórmula está destinada a lactantes nacidos a término y a prematuros con un peso al nacimiento superior a 2.500 g (ESPGAN, 1977). Se caracterizan por cubrir todas las necesidades nutritivas del lactante durante los primeros cuatro o seis meses de vida y pueden ser utilizadas junto con otros alimentos hasta la edad de un año.

Fórmulas o preparados de continuación. Son fórmulas destinadas a la alimentación del lactante a partir de los cuatro o seis meses de edad, momento en que se inicia el paso progresivo a la alimentación diversificada (ESPGAN, 1981).

A partir de esta edad, los mecanismos homeostáticos del organismo están lo suficientemente desarrollados como para permitir una mayor concentración de los nutrientes. La digestión, absorción, las enzimas que intervienen en el metabolismo intermediario y la función renal han alcanzado un grado de madurez suficiente para que el niño pueda recibir una fórmula menos compleja que la inicial. Sin embargo, para cubrir las necesidades nutricionales del niño es necesario modificar la leche de vaca, especialmente su contenido en proteínas y minerales (calcio (Ca) y Fe) así como en hidratos de carbono y vitaminas (Hérrnandez Rodríguez, 1999).

Esta adecuación es importante en aquellos niños que reciben esta fórmula como único aporte lácteo a partir del 4º mes o cuando se utiliza para realizar el destete. A partir del 6º mes, las posibilidades de alimentación son más amplias y la leche de vaca entera esterilizada ya

puede ser utilizada, siempre y cuando la calidad y cantidad de los demás alimentos sea adecuada (Hernández Rodríguez, 1999).

En 1981, el Comité de Nutrición de la ESPGAN publicó unas recomendaciones para la composición de la fórmula de continuación que fueron revisadas en 1990 y 1991. A su vez, la Comisión de las Comunidades Europeas, en la Directiva final de 1991 (*Directiva de la Comisión de 14 de mayo 91/321/CEE relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación*), modificó los límites de edad para el uso de estas fórmulas (Commission of the European Communities, 1991). Las diferencias más importantes con la fórmula de inicio son un mayor valor energético, de contenido proteico, (no siendo necesario modificar la relación lactoalbúmina/caseína), del contenido mineral de Ca, fósforo (P), Fe (en forma de sales ferrosas), sodio (Na), potasio (K) y cloro (Cl), y puede contener polisacáridos (PS) como la dextrinomaltsa, el almidón o harinas además de lactosa, aunque ésta debe seguir siendo el hidrato de carbono predominante. En la Tabla 2 se muestran las recomendaciones para la elaboración de una fórmula de continuación dadas por diferentes organismos oficiales.

**Tabla 2.** Recomendaciones para la elaboración de una fórmula de continuación

| Elementos                               | ESPGAN <sup>1</sup> | COMISIÓN CE <sup>2</sup> | CODEX <sup>3</sup> |
|---|---------------------|--------------------------|--------------------|
| <b>Energía (kcal/100 mL)</b>            | 60-80               | 60-80                    | 60-85              |
| <b>Proteínas (g/100 kcal)</b>           | 3-4,5               | 2,25-4,5                 | 3-5,5              |
| <b>Grasas (g/100 kcal)</b>              | 4-6                 | 3,3-6,5                  | 3-6                |
| Ác. linoleico (g/100 kcal)              | 0,5-1,2             | 0,3                      | 0,3                |
| <b>Hidratos de carbono (g/100 kcal)</b> | 8-12                | 7-14                     | -                  |
| <b>Minerales y oligoelementos</b>       |                     |                          |                    |
| Sodio (mg/100 kcal)                     | 20-85               | -                        | 20-85              |
| Potasio (mg/100 kcal)                   | 80                  | -                        | 80                 |
| Cloro (mg/100 kcal)                     | 55                  | -                        | 55                 |
| Calcio (mg/100 kcal)                    | 90                  | -                        | 90                 |
| Fósforo (mg/100 kcal)                   | 60                  | -                        | 60                 |
| Cociente Ca/P                           | 1-2                 | 2                        | -                  |
| Magnesio (mg/100 kcal)                  | 6                   | -                        | 6                  |
| Hierro (mg/100 kcal)                    | 1-1,7               | 1-2                      | 1-2                |
| Yodo (µg/100 kcal)                      | 5                   | 5                        | 5                  |
| Zinc (µg/100 kcal)                      | 0,5                 | 0,12                     | 0,5                |
| <b>Vitaminas</b>                        |                     |                          |                    |
| A (UI)                                  | 250-750             | 200-600                  | 250-750            |
| D (UI)                                  | 40-120              | 40-120                   | 40-120             |
| E (UI)                                  | 0,7                 | 0,7                      | 0,7                |
| K (µg/100 kcal)                         | 4                   | -                        | 4                  |
| C (µg/100 kcal)                         | 8                   | 8                        | 8                  |
| Tiamina (µg/100 kcal)                   | 40                  | -                        | 40                 |
| Riboflavina (µg/100 kcal)               | 60                  | -                        | 60                 |
| Piridoxina (µg/100 kcal)                | 45                  | -                        | 45                 |
| Cianocobalamina (µg/100 kcal)           | 0,15                | -                        | 0,15               |
| Ác. fólico (µg/100 kcal)                | 4                   | -                        | 4                  |
| Ácido pantoténico (µg/100 kcal)         | 300                 | -                        | 300                |
| Biotina (µg/100 kcal)                   | 1,5                 | -                        | 1,5                |

<sup>1</sup>Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición (ESPGAN), Comité de Nutrición 1977 (ESPGAN, 1977), 1990 (ESPGAN, 1990) y 1991 (ESPGAN, 1991).

<sup>2</sup>Comisión de las Comunidades Europeas, Directiva de la Comisión de 14 de mayo 91/321/CEE (Commission of the European Communities, 1991).

<sup>3</sup>Comisión mixta FAO/WHO del Codex Alimentarius, 1976 (FAO/OMS, 1976) y 1989 (FAO/OMS, 1989).

#### 1.4. Nutrición y metabolismo de los minerales

Los minerales pueden ser divididos en dos grandes grupos en función de la cantidad presente en el organismo (Lindquist, 1987): elementos mayoritarios, que constituyen el 0,5-2% del peso del organismo (calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio y azufre), y elementos minoritarios (hierro, cobre (Cu), manganeso y zinc (Zn)), presentes en muy pequeñas cantidades en el organismo, pero esenciales para un buen funcionamiento y estado nutritivo. A continuación se detalla el metabolismo de los minerales estudiados en el presente trabajo de investigación.

Calcio. El Ca es el 5º elemento químico por orden de abundancia en el organismo, y alrededor del 99% de la cantidad total del mismo se encuentra en el esqueleto en forma de hidroxiapatita, y que consiste en fosfato de Ca (Linder, 1988). Sin embargo, de este porcentaje solamente el 1% se considera Ca fácilmente intercambiable y con capacidad para participar en las actividades metabólicas (Czajka, 1996). El 1% restante del Ca corporal se encuentra en los líquidos extracelulares, las estructuras intracelulares (en una concentración mucho menor que la extracelular) y las membranas de las células. Este Ca extraesquelético tiene un papel fundamental en la conducción nerviosa, la contracción muscular, la coagulación sanguínea y la permeabilidad de las membranas (NRC, 1991).

La concentración de Ca en sangre está regulada por mecanismos homeostáticos que actúan retirando o introduciendo Ca al torrente circulatorio procedente fundamentalmente del tejido óseo, o modulando la intensidad de reabsorción renal. El mecanismo por el cual el hueso cede Ca a la sangre está regulado por la hormona paratiroidea (PTH), la cual a su vez controla la activación de la vitamina D, actuando ambas de forma conjunta. Asimismo, la vitamina D aumenta la reabsorción tubular de Ca en la nefrona y también la absorción intestinal de Ca. Por otra parte, la función principal de la hormona calcitonina es la de reducir la concentración de Ca en el líquido extracelular favoreciendo la mineralización ósea (Linder, 1988).

El proceso de cristalización ósea implica la transformación del fosfato cálcico amorfo en hidroxiapatita. Asimismo, en la superficie de los cristales de hidroxiapatita se encuentran concentraciones diversas de citrato, Mg, carbonato y otros iones que pueden afectar a la mineralización ósea. Por otra parte, es muy probable que la formación de fosfato de Ca a partir de los iones Ca y P del hueso esté controlada por la concentración de fósforo inorgánico (Pi), y a su vez puede depender de la intensidad a la que se libera este Pi, reacción catalizada por la fosfatasa alcalina de los osteoblastos (Krause y Mahan, 1979). Este mecanismo explicaría las altas actividades encontradas de esta enzima en lactantes y niños (Linder, 1988).

La absorción de Ca en el ID tiene lugar por dos vías, una transcelular y otra paracelular. El primero de ellos es un sistema de transporte activo, principalmente en el duodeno y yeyuno, que es activo, saturable y mediado por la vitamina D que aumenta la captación de Ca al estimular la producción de una proteína que se une al Ca. El segundo es un mecanismo de transporte pasivo, no saturable e independiente de la vitamina D que ocurre a todo lo largo del

intestino (Coudray y col., 1997). Aunque la mayoría del Ca se absorbe en el íleon, también puede absorberse en el colon (Czajka, 1996). La eficacia de la absorción aumenta durante los periodos con requerimientos fisiológicos elevados. Así, los niños pueden absorber hasta el 75% de Ca ingerido, en comparación con los adultos jóvenes en los que estas cifras se reducen hasta el 40 o incluso el 20% (NRC, 1991). Entre las sustancias favorecedoras de la absorción del Ca están todas aquellas sustancias que forman sales solubles con este elemento, facilitando su paso a través de la mucosa intestinal, como por ejemplo la vitamina D, la lactosa, el citrato, los hidrogeniones, ciertos aa, e incluso la sacarosa (Linder, 1988). Mientras que las sustancias que forman complejos insolubles con el Ca en el intestino, tales como los fitatos, el ácido oxálico, ácidos urónicos y fibra dietética (FD) (celulosa y hemicelulosa), reducen la biodisponibilidad del mineral (Miller, 1993). En individuos con malabsorción de grasas, la absorción de Ca disminuye debido a la formación de jabones de Ca y AG (Czajka, 1996).

En el plasma, el Ca puede estar como ión libre o ionizado (47%), quelado con moléculas no proteicas, formando complejos principalmente con el citrato, fosfatos y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) (6,5%), y unido a proteínas, especialmente prealbúmina (47%) (Avioli, 1988). Los iones de Ca libres son los que pueden ser directamente accesibles a las células, y cuya concentración está regulada por la PTH y la calcitonina. Las concentraciones de Ca en plasma dependen también de la relación de Ca/P en la dieta, que cuando es muy elevada se produce un aumento de PTH, y consecuentemente se acelera el proceso de desmineralización ósea (Linder, 1988). Las concentraciones séricas de Ca no son indicadores útiles del *estatus* de Ca, puesto que se hallan bajo control homeostático y se mantienen muy constantes (Farré Rovira y Frasquet Pons, 1999).

Cuando la ingestión o la absorción del mineral es inadecuada se produce una mineralización insuficiente del hueso en individuos jóvenes, con la consiguiente disminución de la consistencia ósea (NRC, 1991). El déficit en los niños de este importante mineral puede producir signos de hipoparatiroidismo y baja mineralización ósea, incluso puede inducir la aparición de raquitismo (Prentice y Bates, 1994). La estrategia nutricional más comprometedora para reducir el riesgo de osteoporosis consiste en asegurar una ingesta de Ca que permita obtener la masa ósea máxima, programada genéticamente, durante los años de crecimiento. Se resalta la importancia de cubrir las raciones recomendadas a todas las edades, pero con especial atención a la ingesta durante la niñez y hasta los 25 años de edad (NRC, 1991).

Magnesio. Este mineral se encuentra en el organismo en menor cantidad que el Ca y P. El 60% del Mg corporal se halla en el tejido óseo en forma de cristalina, aunque no es componente de la hidroxiapatita ni es fácilmente intercambiable con el Mg extracelular. Un 39% se reparte de forma equitativa entre el músculo y los tejidos blandos no musculares, y el 1% restante se halla en el fluido extracelular (Gibson, 1990; Czajka-Narins, 1992). Más de 300 sistemas enzimáticos requieren Mg para su funcionamiento, entre estos cabe destacar su aportación como componente del complejo Mg-ATP, esencial en los procesos de biosíntesis, glucólisis y formación de AMP-cíclico, también interviene en la actividad neuromuscular, en la

replicación del ADN y síntesis de ARN, en la síntesis proteica, en la homeostasis del Ca y en el metabolismo del esqueleto por mediación de la PTH y vitamina D (Wester, 1989). El Mg y el Ca, aunque con funciones semejantes, son en algunos casos antagónicos. Así, el exceso de Mg inhibe la calcificación ósea, y un exceso de Ca puede inducir signos de deficiencia de Mg (Czajka-Narins, 1992).

El Mg se absorbe mayoritariamente en el ID, principalmente en el yeyuno, mediante un proceso de difusión facilitada, pero no activa y que se satura a concentraciones intraluminales bajas, y otro de difusión pasiva que funciona a concentraciones altas y que parece ser el predominante. Según Shils (1988) y Fairweather-Tait (1999), no parece existir una regulación hormonal de la absorción de Mg. Aunque este mineral se absorbe principalmente en el ID, una proporción importante del Mg también se absorbe en el colon, según se ha visto en estudios realizados en humanos y con animales de experimentación (Hardwick y col., 1991).

El intervalo de absorción oscila entre el 10% para dietas ricas en Mg, y el 75% en el caso de dietas restrictivas, estimándose un valor medio del 30%. Entre los elementos que disminuyen su absorción están una ingesta elevada de Ca, vitamina D, Pi y ácido fítico (ác. fítico), probablemente debido a la formación de complejos de este mineral (Forbes, 1963; Seeling, 1964). También la absorción de Mg depende de la cualidad y proporción de las proteínas del alimento, del tipo y cantidad de grasas y de la cantidad de Ca y K existente en la dieta (House y Van Campen, 1971; Lee y col., 1972).

El 75% del Mg se transporta en el plasma como iones libres y sólo una pequeña fracción forma complejos con el citrato, fosfato y proteínas, principalmente la albúmina. Los valores de Mg iónico se mantienen en un intervalo estrecho debido a la absorción, excreción y flujo transmembranoso. El riñón conserva el Mg de forma eficaz, en particular cuando la ingesta es baja, excretándose sólo un 4% del Mg filtrado, por lo que existen mecanismos renales de reabsorción, que además tienden a variar inversamente con la del Ca (Czajka, 1996).

Fósforo. El P es un componente esencial del material óseo, encontrándose el 85% del P total del cuerpo adulto (700 g) como cristales de fosfato de Ca en el hueso. Las concentraciones intracelulares de Pi son mucho más altas que las extracelulares, convirtiéndolo en uno de los principales sistemas amortiguadores del pH ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) de los líquidos intracelulares (Linder, 1988). Además, interviene en muchas y variadas reacciones del organismo al ser constituyente de fosfolípidos de las membranas celulares así como de la molécula de adenosín trifosfato (ATP), que supone la fuente principal de energía para la actividad celular (Prieto y col., 1987).

El P es absorbido eficazmente por el ID en forma de Pi libre (Avioli, 1988). Aunque Ca y P tienden a absorberse de forma paralela, el proceso de absorción pasiva no saturable tiene mayor importancia en el caso del P, siendo la absorción función lineal de su concentración en el lumen. No se ha identificado en el intestino ninguna proteína ligante específica para el P, aunque la elevada actividad de la fosfatasa alcalina en la absorción de P parece indicar un posible papel en el transporte activo de este elemento. No obstante, cuando la ingestión de P

es baja la acción de la vitamina D puede favorecer la absorción transcelular de P. Solo el fosfato de la dieta que se encuentra en forma de ác. fítico o fitato (compuesto relativamente abundante en las semillas de cereales, leguminosas y otros vegetales) no puede hidrolizarse en el tracto GI y por tanto no puede ser utilizado por el organismo (Linder 1988), constituyendo el P fítico parte del P no disponible de la dieta. Se ha observado que los lactantes absorben del 65 al 70% del P que se halla en la leche de vaca y del 85 al 90% del que se encuentra en leche humana, mientras que los niños y adultos absorben del 50 al 70% del P presente en las dietas normales y hasta el 90% cuando la ingesta es baja (LSRO, 1981).

La mayor parte del Pi circula en sangre como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{=}$ , una pequeña cantidad como complejo con Ca o Mg, y un 10% se une a proteínas (Farré Rovira y Frasquet Pons, 1999). Aunque aproximadamente de 1/4 a 1/6 de la cantidad corporal de P se elimina por heces, la mayor parte se realiza mediante la excreción urinaria, que está sometida a variaciones según patrones de biorritmos diurnos, mostrando una correlación positiva con la actividad física del individuo. El riñón desempeña un importante papel en el mantenimiento de la fosforemia mediante la reabsorción tubular del 85-90% del P filtrado, a través de un mecanismo activo y saturable regulado por la PTH. No obstante, en los niños la hormona del crecimiento influye más que la PTH en el control renal del P sérico. Si la concentración de P tubular no agota la capacidad máxima de transporte, se reabsorbe prácticamente todo el P y la excreción por orina es baja (Avioli, 1988).

De todas formas, el análisis de P no debe considerarse de forma ajena al de Ca, ya que es muy importante el mantenimiento de un buen cociente Ca/P para un correcto desarrollo y metabolismo óseo. Así, la relación Ca/P de la dieta debe ser 1,3 en los primeros 6 meses de vida y de 1,2 desde los 6 meses al año (NCR, 1991), y cuando ésta es mayor de 1,5 comienzan a aparecer efectos perjudiciales (Aranda y Llopis, 1993).

La deficiencia de P tiene consecuencias graves debido a las importantes funciones que este elemento desempeña, como pérdidas de masa ósea, presencia de bajos contenidos intracelulares de fosfoglicerato y otros ésteres fosfato ricos en energía, cuya deficiencia altera el aporte de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) a los tejidos, produce fallos en la contractibilidad muscular, debilidad muscular grave y fallos cardíacos y respiratorios (Gibson, 1990).

Hierro. Es el elemento traza más abundante en el organismo animal y en el ser humano (Linder, 1988). Alrededor de 2,0-2,5 g están contenidos en la molécula de hemoglobina (Hb), lo que supone un 60-75% del Fe corporal. También se encuentran cantidades traza de este metal en sistemas enzimáticos implicados en el transporte de electrones y en reacciones de fosforilación oxidativa de todas las células (0,5%), así como en algunos enzimas hepáticos (10%), en las moléculas de mioglobina (Mb) de las fibras musculares (5%), unida a la transferrina (0,1%), y el resto (30%) almacenado en el hígado, bazo y médula ósea en la proteína ferritina y en las moléculas de hemosiderina, que posiblemente proviene del fraccionamiento hidrolítico de la propia ferritina (Linder, 1988; Villa Elízaga y col., 1999). La principal función del Fe en el ser vivo es el transporte de  $\text{O}_2$  y la participación en los procesos

redox que se dan en las reacciones de transferencia de electrones de la cadena respiratoria, facilitando la fosforilación oxidativa de ADP a ATP (Aranda y Llopis, 1993).

Al nacer la concentración de Hb es normalmente mayor que en cualquier otro momento de la vida como resultado de la adaptación del feto al ambiente hipóxico del útero. Además, las reservas de Fe almacenado son relativamente abundantes, y como consecuencia la mayoría de los recién nacidos están bien provistos de Fe (Dallman, 1986). Hasta los 4 meses de edad existen pequeños cambios en el contenido total de Fe y son pocas las necesidades de Fe exógeno, ya que los abundantes almacenes de Fe neonatales ayudan a proveer de este Fe para la síntesis de Hb, Mb y enzimas que contengan Fe. Después de los cuatro meses de edad existe un cambio gradual, en el que se pasa de una abundancia de Fe a reservas marginales que caracterizan este periodo de rápido crecimiento. Esta modificación es ante todo debida a la gran cantidad de Fe requerida para mantener la concentración media de Hb (12,5 g/dL) como consecuencia de una expansión rápida del volumen de sangre. Por ello, desde los 4 a los 12 meses se crea la necesidad de un aporte exógeno de Fe, y una gran cantidad de este oligoelemento debe ser absorbida de la dieta (Dallman, 1986).

Generalmente, el Fe dietético se clasifica en dos grandes categorías, Fe hemo y Fe no hemo (Robert y Thomas, 1983). El Fe hemo, que representa sólo el 5-10% del Fe de la dieta, se absorbe hasta en un 25% en la forma de un complejo intacto de porfirina (Hallberg y col., 1979). En cambio el Fe no hemo sólo se absorbe en un 5%, y para ello es necesario que sea disuelto por el ácido gástrico y presentarse así en el duodeno y parte superior del yeyuno en una forma soluble (Monsen y Cook, 1976). El factor más importante que regula la absorción de Fe es la propia necesidad corporal del mineral, dependiendo la capacidad de la mucosa para absorber Fe de la presencia de receptores del catión en la superficie celular. En la luz intestinal el Fe iónico o incluso en forma de quelatos se absorbe uniéndose a receptores específicos de la membrana. Un modelo propuesto para explicar la absorción del Fe no hemo está medido por la transferrina que se secreta en la bilis y permite que el Fe entre en las células mucosas mediante la endocitosis de un complejo receptor de transferrina-Fe-transferrina. La transferrina suele saturarse en 1/3 de su capacidad total para unirse al Fe (TIBC), si no se necesita Fe ésta se mantiene saturada y se absorbe menos a partir de las células mucosas. Un modelo más reciente (Conrad y col., 1994) sugiere que el Fe se une a la mucina en el estómago, donde el pH es ácido, de esta manera el Fe no precipita en el intestino. La mucina libera el Fe a una glucoproteína en la membrana celular, que a su vez lo libera a la mobilferrina en el citosol del enterocito. Una vez fijado, se transfiere al interior de los enterocitos por transporte activo, en el citoplasma se libera de la proteína y se encuentra posiblemente formando quelatos con citrato, fructosa y aa y en equilibrio con el Fe contenido en las moléculas de ferritina. A continuación se desplaza hacia la región serosal del enterocito, donde el Fe se fija a la transferrina y de esta forma se transporta al plasma. El Fe del enterocito que no se transfiere al plasma queda retenido en el interior de la célula como ferritina, hasta que llega el momento de la descamación de estas células y el Fe vuelve de nuevo a la luz intestinal (Linder, 1988). En el

caso del Fe hemo, éste atraviesa la membrana celular del enterocito sin necesidad de transportador y en su interior forma la hemo-oxigenasa (Hallberg, 1981).

Junto a estos mecanismos de absorción, la dieta desempeña un papel importante ya que determinados componentes de ésta pueden actuar como inhibidores o promotores de su absorción. El ác. fítico es uno de los principales inhibidores de la absorción de Fe en los alimentos de origen vegetal (Hallberg y Rossander-Hulthen, 1993). Existen ciertos componentes de la fibra como la hemicelulosa y la lignina que poseen un marcado efecto inhibitorio en la absorción de Fe (Gillooly y col., 1983 y 1984). Otros compuestos con efecto inhibidor son los taninos, cuyo mecanismo de acción se debe a la formación de complejos poco solubles con el Fe, disminuyendo de este modo su biodisponibilidad (Gillooly y col., 1983 y 1984). Ciertos minerales también son inhibidores de la absorción del Fe, tal es el caso del Ca (Hallberg y Rossander-Hulthen, 1993), del Mn que compite con el Fe en su absorción por las células de la mucosa intestinal (Lönnerdal, 1989), y también se ha observado que niveles excesivos de Zn en la dieta impiden la utilización del Fe, y por lo tanto causan anemia (O'Dell, 1989).

En cuanto a los compuestos que mejoran la absorción de Fe, el ácido ascórbico (ác. ascórbico) es quizá el promotor más conocido de la absorción de Fe no hemo, que además se ve potenciado por efecto de la vitamina E (Greenberg y col., 1979), sin embargo no posee ningún efecto sobre el Fe hemo (Hallberg, 1981). El origen de las proteínas determina un efecto positivo o negativo sobre la absorción de Fe (Barberá y Farré, 1992), por ejemplo la caseína parece aumentar la absorción de Fe (Peters y col., 1992), la fosfovitina del huevo reduce su absorción, mientras que las proteínas de la carne y pescado también la aumentan (Barberá y Farré, 1992). Igualmente se ha observado que pequeñas cantidades de ác. cítrico, málico, tartárico y láctico, pueden aumentar sustancialmente la absorción de Fe (Craig, 1994), así como la fructosa, que forma complejos con el Fe, incrementa también su absorción (Pollack y col., 1965).

El mecanismo de intercambio del Fe comienza cuando los eritrocitos viejos son fagocitados principalmente en el bazo e hígado, transfiriéndose el Fe procedente de las moléculas de Hb a la transferrina para ser transportado hacia la médula ósea y resintetizar la Hb (Siimes y Dallman, 1974). Parte del Fe procedente de los propios eritrocitos pasa a formar parte de las moléculas de ferritina (y hemosiderina) en el interior de las células del retículo endotelial, en los hepatocitos y también en la médula ósea. Para que el Fe contenido en la ferritina sea movilizado hacia los tejidos hematopoyéticos debe reducirse a la forma ferrosa, ser quelado, y luego transferirse al plasma, donde para ser transportado por la transferrina, debe ser reoxidado a la forma férrica. Se ha descrito que la proteína plasmática ceruloplasmina puede tener un importante efecto en estos procesos de transferencia de Fe. Por otra parte, los iones de Fe que los eritrocitos puedan perder en el torrente sanguíneo son transportados gracias a la capacidad fijadora de dos proteínas plasmáticas, la haptoglobina (que fija Hb) y hemoxipexina (que fija anillos porfíricos). Ambas en el hígado ceden los iones de Fe a la ferritina de los hepatocitos (Linder, 1988).

La deficiencia de Fe infantil está reconocida como la más común en todo el mundo (Craig, 1994) afectando a miles de niños tanto de países industrializados como subdesarrollados (Haschke y Nosheen, 1991). En un estadio avanzado, la deficiencia de Fe da lugar a una anemia ferropénica, que cuando es grave se caracteriza por ser microcítica e hipocrómica (Yip y Dallman, 1988; NRC, 1991). Además, va acompañada de un aumento de la concentración de transferrina circulante y consecuentemente por una mayor capacidad sérica de fijación de Fe, y de una reducción de la concentración sérica de ferritina (Linder, 1988). Actualmente se sabe que la carencia de Fe sin anemia puede dar lugar a una reducción de la capacidad física para realizar esfuerzos, reducción de la actividad mental y por consiguiente del rendimiento escolar en los niños, incremento del riesgo de prematuridad, disminución de las defensas frente a agentes infecciosos y alteración de la estructura y función GI (Lozoff y Brittenham, 1986; Lozoff y col., 1991). Aunque los niños raramente desarrollan deficiencia de Fe antes de los 6 y 8 meses de edad (Dallman y col., 1986), si durante un periodo corto de tiempo existe una ligera deficiencia entre los 6 y 12 meses, ésta puede originar consecuencias negativas a largo plazo para la salud y el desarrollo escolar, ya que coincide con el rápido crecimiento y diferenciación del cerebro (Volpe, 1987).

#### 1.4.1. Necesidades nutricionales de los minerales

El organismo humano contiene aproximadamente un 4% de minerales que deben ser aportados por la dieta (Linder, 1988). Las necesidades de elementos minerales durante el primer año de vida son muy importantes ya que juegan un papel esencial en la mineralización ósea y el desarrollo físico y mental. Es necesario establecer los requerimientos nutricionales del niño para evitar las enfermedades que derivan de una insuficiencia mineral, tanto a corto plazo como en la edad adulta (Moya y col., 1990). En la Tabla 3 se pueden observar las necesidades de los distintos minerales en los primeros tres años de vida, según las raciones diarias recomendadas (RDR) del NRC (1991).

**Tabla 3.** Recomendaciones diarias de minerales en los tres primeros años de vida

|                    | EDAD      |            |          |
|--------------------|-----------|------------|----------|
|                    | 0-6 meses | 6-12 meses | 1-3 años |
| Calcio (mg/día)    | 400       | 600        | 800      |
| Fósforo (mg/día)   | 300       | 500        | 800      |
| Magnesio (mg/día)  | 40        | 60         | 90       |
| Hierro (mg/día)    | 6         | 10         | 10       |
| Zinc (mg/día)      | 5         | 5          | 10       |
| Yodo (mg/día)      | 40        | 50         | 70       |
| Selenio (µg/día)   | 10        | 15         | 20       |
| Cobre (mg/día)     | 0,4-0,6   | 0,6-0,7    | 0,7-1    |
| Manganeso (mg/día) | 0,3-0,6   | 0,6-1      | 1-1,5    |

Adaptado del NRC (1991)

Calcio y Fósforo. En los lactantes alimentados a pecho, la leche materna aporta alrededor de 300 mg de Ca al día, de los que se absorbe el 75%, mientras que en los alimentados con lactancia artificial puede descender hasta un 20%, dependiendo entre otros factores, de la clase y la cantidad de grasa que contienen los alimentos. En este sentido, Martí-Hennerberg (1993) y Hernández Rodríguez (1999) han descrito que la pérdida fecal de grasa y Ca están íntimamente correlacionadas. Los expertos en nutrición infantil hacen las siguientes recomendaciones en relación con el aporte de Ca en la dieta: 50 mg de Ca/100 kcal, que es aproximadamente el contenido en Ca de la leche materna (FAO/OMS, 1976) ó 60-75 mg/100 kcal (ESPGAN, 1977).

Los lactantes alimentados con fórmulas cuyo contenido en P es superior al de la leche materna (15 mg/100 mL) excretan una gran parte en la orina, como consecuencia de lo cual aumenta la carga renal de solutos, y por tanto la osmolaridad. Como el aclaramiento del P no está desarrollado completamente al nacimiento, un exceso de P supondría, además del riesgo de hiperfosfatemia, un cuadro secundario de hipocalcemia (Hernández Rodríguez, 1999). Para minimizar este riesgo, el Comité de la ESPGAN recomienda que los aportes de P oscilen entre 30-50 mg/100 kcal (20-35 mg/100 mL) y la relación Ca/P no sea inferior a 1,2 ni superior a 2.

Magnesio. El aporte óptimo no está completamente establecido y el Comité de la ESPGAN recomienda un mínimo de 6 mg/100 kcal (4 mg/100 mL), que equivale a una ingesta diaria de 40-70 mg. Según los cálculos actuales, la ingesta de magnesio (Mg) a través de la lactancia materna excede en 45 veces las necesidades estimadas en el lactante (Martí-Hennerberg, C. 1993; Hernández Rodríguez, 1999).

Hierro. La leche humana y la de vaca tienen un contenido entre 0,01-0,05 mg/100 mL. Tanto una como otra permiten cubrir las necesidades del recién nacido y lactante sano en las primeras ocho semanas de vida. A partir del tercer mes el niño necesita aproximadamente 1 mg/kg/día, y puesto que el coeficiente de absorción del Fe es de 7-15%, las fórmulas utilizadas para la alimentación de los lactantes a partir del tercer mes deben estar enriquecidas con Fe, recomendándose una concentración igual o superior a 1 mg/100 kcal, sin que la ingesta total exceda los 15 mg/día (Hernández Rodríguez, 1999).

## 2. ALIMENTOS FUNCIONALES

En la última década los conceptos básicos en nutrición están cambiando, hasta ahora la idea tradicional de una “dieta adecuada” estaba referida únicamente al aporte de nutrientes suficientes para asegurar la supervivencia de un individuo, satisfacer sus necesidades metabólicas, y complacer su sensación de hambre. En la actualidad el énfasis se acentúa en la potencialidad de los alimentos para la promoción de la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de enfermedades. Así, el concepto de *nutrición adecuada* tiende a ser sustituido por el de *nutrición óptima*, en cuyo ámbito aparecen los *alimentos funcionales*, denominación no muy acertada, pues a juicio de Palou y Serra (2000) todos los alimentos y sus componentes tienen una función.

Un alimento puede ser considerado funcional si se ha demostrado suficientemente que afecta de forma beneficiosa (más allá de proporcionar una nutrición adecuada desde el punto de vista tradicional) a una o varias funciones relevantes del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar y/o reduce el riesgo de padecer enfermedad (Roberfroid, 1995).

En la Unión Europea, el SCF desarrolla diversos programas en relación con los alimentos funcionales, así como la evaluación de nuevos alimentos de acuerdo con el *Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios*, entre los que se encuentran algunos ingredientes funcionales. El SCF de la Comisión Europea (Dirección General de Salud y Seguridad del Consumidor), constituido por 19 científicos y expertos independientes, establece el marco científico de referencia sobre el que basar sus opiniones a la hora de aceptar o no un nuevo alimento como seguro y adecuado para el consumo humano (Commission of the European Communities, 1997a; 1997b).

### 2.1. Concepto de alimento funcional

Los alimentos funcionales son nuevos alimentos obtenidos por diversos procedimientos, con la característica particular de que alguno de sus componentes, sea o no nutriente, afecta a funciones diana del organismo, de manera específica y positiva, y promueve un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. El efecto positivo de un alimento funcional puede ser tanto su contribución al mantenimiento del estado de la salud y bienestar como la reducción del riesgo de padecer una determinada enfermedad (Diplock y col., 1999). Un alimento funcional puede ser un alimento natural o modificado (alterando, añadiendo o eliminando uno o varios de sus componentes) o una combinación de ambos. Además, puede ser funcional para la población en general o para grupos particulares de la población, definidos por sus características genéticas, sexo, edad o por otros factores.

Todo ello permite a las industrias alimentarias el desarrollo de nuevos productos con un valor potencial añadido en el mercado, siendo uno de sus aspectos más notables el desarrollo

de alimentos de diseño, es decir de productos con funciones adicionales a las del alimento original (Cantor, 2000). Sin embargo y como referencia, en el Reglamento (CE) nº 258/97 se recoge el concepto de *equivalencia sustancial*, que expresa la idea de que los organismos ya existentes o los productos utilizados como alimentos o como fuente de ellos, pueden servir de base o referencia para compararlos con los nuevos alimentos modificados. El desarrollo de alimentos funcionales constituye una oportunidad real de contribuir a la mejora de la calidad de la dieta y a la selección de alimentos que pueden afectar positivamente la salud y el bienestar del consumidor. En este sentido, la perspectiva europea difiere de la norteamericana, ya que considera los alimentos funcionales como *nutraceúticos* o *farmaalimentos*. Así pues, el concepto de alimento funcional incluye que, como componentes habituales de la dieta, deben ejercer sus efectos en cantidades consumidas normalmente en una dieta equilibrada, y se excluye como tales a las píldoras, cápsulas y tabletas (Diplock y col., 1999; Milner, 2000).

## **2.2. Dianas que presentan un mayor interés en el desarrollo de nuevos alimentos**

De acuerdo con las conclusiones elaboradas en el *documento consenso* sobre los alimentos funcionales (Diplock y col., 1999), las dianas con mayor interés en el desarrollo de nuevos alimentos son las que afectan a las siguientes funciones:

### **1- Crecimiento, desarrollo y diferenciación**

- Dieta de gestantes: evitar malformaciones
- Leche de lactantes: suministrar dieta óptima
- Efectos sobre el ciclo celular en tejidos específicos

### **2- Metabolismo intermediario, sistema cardiovascular y antioxidantes**

- Reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares
- Control de la resistencia a insulina: diabetes tipo 2, obesidad
- Estrés oxidativo celular y tisular

### **3- Metabolismo de xenobióticos**

- Modulación por componentes de la dieta
- Control de toxicidad y carcinogenicidad por contaminantes alimentarios

### **4- Sistema gastrointestinal**

- Mejora de la microflora colónica
- Biodisponibilidad de nutrientes
- Promoción de la actividad inmunitaria intestinal
- Modulación de la proliferación celular del epitelio intestinal

### **5- Humor y comportamiento**

- Mejora de las capacidades cognitivas
- Modulación del estado psicológico
- Aumento de la calidad de vida y de su percepción

Un producto alimenticio se puede convertir en un alimento funcional mediante cinco estrategias básicas:

1. Eliminación de un componente, del cual se sabe que causa un efecto perjudicial para el consumidor, como ocurre con la eliminación de la proteína del gluten del trigo.

2. Incremento de la concentración de un componente natural del alimento, de manera que se pueda alcanzar una concentración superior a la habitual, y que ello suponga inducir resultados positivos sobre la salud. La adición de Ca de la leche o de vitaminas y minerales en cereales pueden englobarse en este grupo de alimentos funcionales.
3. Adición de un componente, que no se halla normalmente presente en la mayoría de los alimentos, pero que se ha demostrado que causa efectos beneficiosos, tal y como sucede con la adición de fibra en el yogurt.
4. Sustitución de un componente que provoca efectos no deseables por otro que tiene efectos neutros o beneficiosos sobre la salud, como sustituir grasas saturadas por hidratos de carbono no solubles en leche y helados.
5. Alteración de la biodisponibilidad metabólica, ya sea mejorando la de compuestos que producen efectos beneficiosos o dificultando la de componentes perjudiciales. El aumento de transferrina en leche sería un ejemplo del 1<sup>er</sup> punto, mientras que la disminución de fitosteroles lo sería del 2<sup>o</sup>.

Puede deducirse que estas estrategias abarcan dos grandes grupos de health claims (proclamas alimentarias reivindicativas de un efecto beneficioso para la salud): aquellas que proclaman el aumento de la función original del alimento y por tanto, pueden suponer una mejora de la salud, y aquellas que proclaman la reducción del riesgo de padecer enfermedades.

### **2.3. Proclamas alimentarias reivindicativas de efectos beneficiosos para la salud**

Definida en 1991 por el Codex Alimentarius como "cualquier representación que afirma, sugiere o implica que un alimento tiene ciertas características relacionadas con su origen, propiedades nutricionales, naturaleza, producción, procesamiento, composición o cualquier otra cualidad" (Diplock y col., 1999).

En Japón, la investigación sobre alimentos funcionales empezó activamente ya a principios de los 80, y en 1986 se implementaron los primeros programas específicos. En 1991 se introduce el concepto de alimentos para usos específicos en el fomento de la salud (*Foods for Specified Health Use*, FOSHU). Éstos deben estar en la forma de alimentos ordinarios, no en cápsulas ni pastillas, y se asume que se consumen como parte de la dieta habitual. La mayor parte de los productos que han sido aprobados contienen oligosacáridos (OS) o bacterias como factores que promueven la salud a nivel intestinal (Diplock y col., 1999). La legislación japonesa, situada a la vanguardia mundial de alimentos funcionales, reconoce doce clases diferentes de ingredientes como favorecedores de la salud: FD, OS, azúcares, péptidos y proteína, glúcidos, alcoholes, isoprenoides y vitaminas, colinas, bacterias acidolácticas (BAL), minerales, AG poliinsaturados y otros.

Tanto la Food and Drug Administration (FDA) en EEUU, como el SCF en Europa, se basan en la información científica disponible, y en el acuerdo sustancial entre expertos

cualificados, de forma que los *health claims* propuestos responden a las evidencias científicas. Partiendo de dichos estudios científicos se pueden considerar cuatro tipos principales de reivindicaciones sobre la salud que sirven de base para su aprobación en la Unión Europea (Diplock y col., 1999; Ross, 2000):

- Tipo I: Proclamas relacionadas con recomendaciones dietéticas o con dietas consideradas sanas. Por ejemplo dietas bajas en grasas saturadas y elevadas en fibra.
- Tipo II: Proclamas del contenido en nutrientes. Adoptan la expresión “es fuente de Ca”, “tiene elevado contenido en fibra” y “es bajo en grasa”.
- Tipo III: Comparativas del contenido en nutrientes entre dos o más alimentos. Hacen referencia a menores niveles de grasa y COL, mayor abundancia de vitaminas y Fe.
- Tipo IV: Proclamas de la funcionalidad de nutrientes. Entre estas podemos citar aquellas que indican “el Ca ayuda al correcto desarrollo de huesos y de dientes más fuertes” o “el ácido fólico contribuye a asegurar el desarrollo normal del feto”.

Sin embargo, estas cuatro categorías no hacen referencia a las consecuencias que podrían derivarse de un consumo excesivo, por encima de los niveles recomendados en una dieta equilibrada. Así, recientemente se han propuesto dos nuevas categorías para cubrir de forma específica las particularidades adicionales de los alimentos (Diplock y col., 1999):

- Reivindicaciones de aumento de función (tipo A). Efecto(s) beneficioso(s) específico(s) de la(s) interacción(es) entre un componente del alimento y una(s) actividad(es) biológica(s), fisiológica(s) o psicológica(s), más allá de las establecidas por su papel nutritivo tradicional. Por ejemplo, el efecto de ciertos oligosacáridos no digeribles (OND) sobre bacterias de la microflora intestinal o, de los folatos sobre la homocisteína.
- Reivindicaciones de reducción del riesgo de enfermedad (tipo B). Reducción del riesgo de padecer una enfermedad mediante el consumo de un o una mezcla de componente(s) específico(s) o ingrediente(s) alimenticio(s). Como ejemplo podría citarse la expresión “el Ca reduce del riesgo de osteoporosis”.

#### **2.4. Oligosacáridos no digeribles (OND) como ingredientes alimenticios funcionales**

Son numerosas las sustancias que han sido descritas como alimentos funcionales, bs fitosteroles y vitamina E, probióticos (lactobacilos y bifidobacterias), prebióticos (inulina y oligofruktosa) y simbióticos (probióticos más prebióticos), licopeno, polifenoles e isoflavonas. Sin embargo cabría destacar la importancia de los OND como firmes candidatos a ser incluidas en esta categoría. A pesar de que los OND se encuentran como componentes naturales en muchos alimentos comunes como la fruta, legumbres, leche y miel, durante la pasada década

su popularidad como ingredientes alimenticios ha aumentado rápidamente, particularmente en Japón y Europa (Sako y col., 1999). En 1991 el gobierno japonés legisló sobre los FOSHU entre los que se incluyeron a los fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), sojaoligosacáridos (SOS) y palatinosaoligosacáridos (POS). En 1996 la lista de FOSHU incluía un total de 58 alimentos aprobados, de los cuales treinta y cuatro reúnen a OS como ingredientes funcionales, incluyendo a la lactulosa, lactosucrosa, xilooligosacáridos (XOS) e isomaltooligosacáridos (IOS) (Crittenden, y Playne, 1996). En Europa hay dos clases que se usan ampliamente, la inulina y FOS, y los  $\beta$ -GOS (Salminen y col., 1998; Sako y col., 1999).

Esta popularidad se ha debido principalmente a los posibles beneficios para la salud que se han asociado con el consumo de estos compuestos. Sus propiedades nutritivas se originan principalmente en su resistencia a las actividades hidrolíticas en la parte superior del tracto digestivo de los animales monogástricos, seguidos por una extensa fermentación en el intestino grueso. Además, debido a su capacidad de estimular selectivamente el crecimiento de las bifidobacterias de la microbiota del colon, han sido propuestos como sustancias con carácter prebiótico. Las áreas más prometedoras para el desarrollo de tal afirmación son:

1. Alivio del estreñimiento por el efecto de aumento de deposición y posiblemente de los efectos sobre la motilidad intestinal (Kleessen y col., 1997b).
2. Inhibición de la diarrea, especialmente cuando está asociada con infecciones intestinales. Esto puede estar directamente relacionado con el posible efecto inhibitorio de las bifidobacterias sobre las bacterias gram-positivas y gram-negativas (Wang, 1993; Wang y Gibson, 1993).
3. Reducción del riesgo de osteoporosis si ciertamente mejoran la biodisponibilidad de Ca, y si este efecto funcional es seguido por un cambio fisiológico en la densidad y masa ósea (Roberfroid y Slavin, 2000).
4. Reducción del riesgo de aterosclerosis (enfermedad cardiovascular asociada con dislipidemia, especialmente hipertrigliceridemia e insulina resistente) que está asociada con un régimen de alimentación de hidratos de carbono hipercalórica (Aarsland y col., 1996).
5. Reducción del riesgo de obesidad y posiblemente diabetes no insulino dependiente que están asociadas con la resistencia a la insulina (Roberfroid y Slavin, 2000).

### 3. BIFIDOBACTERIAS

#### 3.1. Descubrimiento e historia

En 1899, en el Instituto Pasteur, Tissier observó y aisló de las heces de niños una bacteria con una inusual, y hasta entonces desconocida, forma de Y. A comienzos de siglo, la taxonomía se basaba enteramente en criterios morfológicos y Tissier (1900) denominó a esta bacteria *Bacillus bifidus communis*. Al mismo tiempo, pero en Italia, Moro (1900a) descubrió en condiciones similares una bacteria que reconoció como diferente de la de Tissier y que identificó como perteneciente al género *Lactobacillus*. A pesar de las diferencias entre estas dos bacterias, Holland (1920) propuso un nombre común: *Lactobacillus bifidus*. Fue necesario esperar hasta 1965 y el progreso de la genética molecular para que el equipo de Sebald y col. (1965) demostraran que el porcentaje de guanina más citosina (G+C) en el ADN de las especies del género *Bifidobacterium* difería del de los géneros *Lactobacillus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*. Además en 1967, De Vries y Stouthamer demostraron la presencia en las bifidobacterias de un enzima específica de este género como es la fructosa-6 fosfato fosfocetolasa (F6PPK) y la ausencia de la aldolasa y de la deshidrogenasa glucosa-6 fosfatasa, dos enzimas presentes en los lactobacilos. Por tanto, la clasificación de las bifidobacterias en el género *Lactobacillus* no estaba justificada. En 1974, la 8ª edición del Manual de Bergey de la determinación bacteriológica reconoció a las bifidobacterias como un género por derecho propio consistente en 11 especies (Buchanan y Gibbons, 1974).

Hoy en día dentro del género *Bifidobacterium* se incluyen treinta especies, diez de las cuales son de origen humano (presentes en la caries dental, heces y vagina), diecisiete del tracto intestinal animal y del rumen, dos de aguas residuales y una de leche fermentada, tal y como se muestra en la Tabla 4 (Gomes y Malcata, 1999).

#### 3.2. Morfología, fisiología, metabolismo y ecología

Las bifidobacterias se caracterizan por ser gram-positivas, no esporuladas, inmóviles y catalasa-negativas. Son pleomórficas, incluyendo las formas de bacilos cortos, bacilos curvados, bacilos con forma de porra y bacilos bifurcados con forma de Y (Sgorbati y col., 1995).

Son microorganismos anaerobios estrictos, sin embargo el grado de tolerancia del O<sub>2</sub> depende de la especie y del medio de cultivo (De Vries y Stouthamer, 1969). En presencia de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), la sensibilidad al O<sub>2</sub> varía considerablemente dependiendo de la cepa (Scardovi, 1986). Además, Cheng y Sandine (1989) encontraron un crecimiento satisfactorio en bifidobacterias incubadas sin condiciones anaeróbicas en un medio de cultivo con base de suero, L-cisteína y extracto de levadura.

**Tabla 4.** Especies del género *Bifidobacterium* en función de su origen

| <b>Origen</b>                     |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| <b>Humano</b>                     |                             |
| <i>B. adolescentis</i>            | <i>B. dentium</i>           |
| <i>B. angulatum</i>               | <i>B. globosum</i>          |
| <i>B. bifidum</i>                 | <i>B. infantis</i>          |
| <i>B. breve</i>                   | <i>B. longum</i>            |
| <i>B. catenulatum</i>             | <i>B. pseudocatenulatum</i> |
| <b>Intestino y rumen animales</b> |                             |
| <i>B. animalis</i>                | <i>B. magnum</i>            |
| <i>B. asteroides</i>              | <i>B. merycicum</i>         |
| <i>B. boum</i>                    | <i>B. pseudolongum</i>      |
| <i>B. coryneforme</i>             | <i>B. pullorum</i>          |
| <i>B. cuniculi</i>                | <i>B. ruminantium</i>       |
| <i>B. choerinum</i>               | <i>B. saeculare</i>         |
| <i>B. gallicum</i>                | <i>B. suis</i>              |
| <i>B. gallinarum</i>              | <i>B. thermophilum</i>      |
| <i>B. indicum</i>                 |                             |
| <b>Agua residual</b>              |                             |
| <i>B. minumun</i>                 |                             |
| <i>B. subtile</i>                 |                             |
| <b>Leche fermentada</b>           |                             |
| <i>B. lactis</i>                  |                             |

Adaptada de Gomes y Malcata (1999)

La temperatura óptima de crecimiento para el desarrollo de las especies humanas, como es natural, oscila entre 37 y 41 °C. No hay crecimiento por debajo de 20 °C y no resisten la temperatura por encima de 46 °C; *B. bifidum* muere a 60°C (Rasic y Kurman, 1983). El pH inicial óptimo de crecimiento está entre 6 y 7. No crecen por debajo de 4,5-5 ni por encima de 8-8,5 (Scardovi, 1986).

Las bifidobacterias están agrupadas filogenéticamente en la rama actinomicete de las bacterias gram-positivas (Sgorbati y col., 1995), que se caracteriza por un elevado contenido en G+C (entre 54 y 67 mol%). El tipo de peptidoglucano de la pared celular varía en función de que el aa básico presente en el tetrapéptido sea ornitina o lisina. Los fosfolípidos de la pared celular son igualmente variados tales como el poliglicerolfosfolípido y sus liso-derivados, alanilfosfatidilglicerol y los lisoderivados del difosfatidilglicerol.

El metabolismo de los azúcares es heterofermentativo (Mital y Carg, 1992). Son organismos sacarolíticos que producen ácido acético y láctico sin generación de CO<sub>2</sub>, excepto en la degradación de gluconato (Kurman y Rasic, 1991). Las hexosas son degradadas exclusiva y específicamente por la ruta de la fructosa 6-fosfato descrita por Scardovi y Trovatelli (1965). La fermentación de 2 moles de glucosa da lugar globalmente a 3 moles de acetato y 2 de lactato. De este modo se produce un ratio molar teórico (acético:láctico) de 1,5, y el ác. láctico producido está en la forma L(+). La enzima característica del metabolismo del azúcar por el género *Bifidobacterium* es la F6PPK. Esta enzima, que es específica de género, está ausente en las bacterias anaerobias que podrían confundirse morfológicamente con las bifidobacterias,

como las pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* y *Actinomycetaceae* (Scardovi y Trovatelli, 1965). Todas las bifidobacterias de origen humano son también capaces de utilizar, además de la glucosa, la galactosa, lactosa y comúnmente la fructosa como fuentes de carbono. Las bifidobacterias también son capaces de fermentar en algunos casos hidratos de carbono complejos como lo demuestra un estudio realizado por Crociani y col. (1994) con 290 cepas de 29 especies de bifidobacterias de origen humano y animal. Deguchi y col. (1985) se interesaron en la síntesis de seis vitaminas por las bifidobacterias de origen humano: tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), piridoxina (B<sub>6</sub>), ácido fólico (B<sub>9</sub>), cianocobalamina (B<sub>12</sub>) y ácido nicotínico (PP). Cinco de estas vitaminas (excepto la vitamina B<sub>2</sub>) fueron sintetizadas por la mayoría de las cepas examinadas y además, las vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub> se excretaron en gran proporción. Estos autores también describieron que *B. bifidum* y *B. infantis* fueron buenos productores de las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>9</sub> y PP, mientras que *B. breve* y *B. longum* las produjeron en pequeñas cantidades y *B. adolescentis* no sintetizó ninguna de estas vitaminas.

La mayoría de las bifidobacterias son capaces de usar las sales de amonio (NH<sup>4+</sup>) como su única fuente de nitrógeno (N) (Hassinen y col., 1951). *B. bifidum* crece solamente en presencia de Mg, Mn y sobre todo de Fe. El Fe es quizás asimilado por *B. bifidum* en ambas formas oxidadas (Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>) dependiendo de la acidez del medio (Bezkorovainy y col., 1996).

En la bibliografía científica han sido descritas numerosas sustancias que pueden actuar como factores de crecimiento de las bifidobacterias. En 1953 György, describió en la leche humana una serie de derivados del *N*-acetilglucosamina que hoy día se sabe que son necesarios para el crecimiento de las bifidobacterias y se denominan factores bifidogénicos (Modler y col., 1990). Se distinguen tres grupos principales de factores bifidogénicos que dependen de la especie y que se denominan factor BB (BF1, BF2 y glicoproteínas) para *B. bifidum*, factor BI para *B. infantis* y factor BL para *B. longum*. La lactoferrina y sus tres complejos metálicos (Fe, Cu, Zn) tienen un efecto estimulante del crecimiento en ocho especies del género *Bifidobacterium* (cinco de origen humano y tres de origen animal) al comienzo de la fase logarítmica de su crecimiento (Shimamura, 1989). La lactulosa no se metaboliza en el ID del hombre ni de los animales. *In vivo*, puede incrementar el desarrollo de *B. bifidum*. Sin embargo, este factor no es activo *in vitro* y no está presente en estado libre en la leche materna. Su acción es debida al hecho de que resiste mejor que la lactosa la degradación por lactasas en el tracto digestivo y por tanto puede ser usada por las bifidobacterias, aunque también podría ser metabolizado por otras bacterias intestinales (Yazawa y Tamura, 1982). Por último, se ha descrito que determinados OS estimulan el crecimiento de las bifidobacterias. Este tipo de hidratos de carbono será discutido más ampliamente en el punto 7 de esta sección. Sin embargo, podemos destacar aquí que la rafinosa, estaquiosa e inulina son usadas específicamente por *B. infantis* y no por otras bacterias intestinales como *E. coli*, *L. acidophilus* y *S. faecalis* (Yazawa y col., 1978). Los FOS también son metabolizados por las bifidobacterias,

además de por otro tipo de bacterias, y no son degradados por las enzimas digestivas humanas ni generalmente por bacterias indeseables dentro del tracto digestivo (Mitsuoka y col., 1987).

Aunque la sensibilidad de las bifidobacterias frente a los antibióticos no ha sido muy investigada y las condiciones experimentales son variables, puede ser aceptado que la sensibilidad de las especies varía entre 10 y 500 µg de antibiótico /mL (La Vergne y col., 1959), siendo la mayoría de las bifidobacterias resistentes a numerosos antibióticos y de forma notable al ác. nalidíxico, gentamicina, kanamicina, metronidazol, neomicina, polimixina B y estreptomina. Por el contrario, la ampicilina, bacitracina, cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, lincomicina, nitrofurantoína, oleandomicina, penicilina G y vancomicina inhiben fuertemente a la mayoría de las especies (Scardovi, 1986).

Las bifidobacterias son microorganismos de gran importancia en el activo y complejo ecosistema del tracto intestinal de los humanos y otros animales de sangre caliente, y de las abejas (Sgorbati y col., 1995). Están distribuidos en varios nichos ecológicos en el tracto GI y genitourinario, y su proporción está determinada principalmente por la edad y la dieta. Como ejemplo podemos citar que la microflora natural de los bebés está dominada por bifidobacterias que se establecen al poco de nacer, descendiendo su número con la edad hasta situarse tras los géneros *Bacteroides* y *Eubacterium*. Además, el perfil de especies constituyentes también cambia; *B. infantis* y *B. breve*, típicos en los bebés, son reemplazados por *B. adolescentis* en los adultos, mientras que *B. longum*, persiste toda la vida (Mitsuoka, 1990c). Estos cambios pueden obviamente estar influidos tanto por el consumo de factores bifidogénicos (Modler, 1994) como por la fisiología del hospedador (Kurmann y Rasic., 1991).

Aunque las bifidobacterias han estado implicadas en infecciones del aparato genitourinario (Darbas y col., 1989), sólo una especie es considerada como patógena para el hombre: *B. dentium*, que causa caries dental (Sgorbati y col., 1995).

### **3.3. Medios y parámetros de cultivo**

Se ha afirmado que un elevado número de bifidobacterias en el colon es positivo para la salud humana, puesto que puede prevenir la colonización de patógenos, y podría tener efectos positivos sobre el peristaltismo intestinal, el sistema inmune, la prevención del cáncer y el metabolismo del COL e hidratos de carbono en el colon (Mitsuoka, 1990c; Ishibashi y Shimamura, 1993). Por estas razones las bifidobacterias se han añadido como probióticos, especialmente en productos lácteos (Tamime y col., 1995). Debido a este interés se ha hecho necesario tener un método rápido, seguro y relativamente barato para determinar las bifidobacterias tanto en heces como en alimentos. Se podrían aplicar varios métodos, como los recuentos en placa, métodos basados en la detección de ADN (Ito y col., 1992) o métodos enzimáticos (Scardovi, 1986). Para el control de calidad en productos lácteos, o para estudios de la flora fecal con un gran número de muestras, los métodos de recuento en placa son

todavía preferibles. Por tanto, se hace necesario el disponer de un medio que promueva selectivamente el crecimiento de la mayoría de bifidobacterias mientras suprime la gran parte de otras bacterias fecales o aisladas en productos lácteos, como lactobacilos y estreptococos (Hartemink y col., 1996). Debido a los numerosos medios descritos para el cultivo de las bifidobacterias, se llega a la conclusión que no existe un medio estándar para la detección de las mismas. Rasic y Sad (1990) indicaron que los dos factores importantes en la detección y recuento de bifidobacterias son un medio de cultivo adecuado y condiciones de anaerobiosis.

En la siguiente tabla (Tabla 5) se enumeran los medios de cultivo básicos y no selectivos empleados para bifidobacterias. Este tipo de medios es útil para el recuento rutinario de bifidobacterias cuando están presentes en leches no fermentadas y en leches fermentadas con bifidobacterias. Su finalidad es la de determinar el inóculo inicial y averiguar el tiempo que estos microorganismos permanecen viables durante su almacenamiento.

**Tabla 5.** Medios de cultivo básicos y no selectivos para bifidobacterias en productos lácteos

| Abreviatura del medio | Nombre del medio             | Concentración final de los aditivos   |
|-----------------------|------------------------------|---|
| BL                    | Glucose Blood-Liver          | -   |
| CLB                   | Columbia base                | -   |
| LCL                   | Liver Cysteine Lactose       | -   |
| mBL                   | BL modificado sin sangre     | L-cisteína HCl, 0,05%   |
| mMRS                  | MRS modificado               | L-cisteína HCl, 0,05%   |
| mMRS+sangre           | MRS modificado               | L-cisteína HCl, 0,05%<br>Sangre de oveja (10 mL)                            |
| mRCM                  | RCM modificado               | Lactosa 1,0%<br>Sangre humana (50 mL)                                       |
| MRS                   | De Man Rogosa Sharpe         | -   |
| RCM                   | Reinforced Clostridia Medium | -   |
| RCPB                  | RCM                          | Azul de prusia 0,03%  |
| TPY                   | Tryptone Phytone Yeast       | -   |
| X- $\alpha$ -Gal      | MRS                          | X- $\alpha$ -Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactopiranosido) |

Adaptado de Rasic y Kurmann, (1983); Samona y Robinson (1991) y Arroyo y col. (1994)

Para un correcto recuento de bifidobacterias se han hecho varios intentos por obtener un medio selectivo para el aislamiento de esta especie frente a otros microorganismos lácteos relacionados, especialmente estreptococos y lactobacilos (Sozzi y col., 1990). Estos medios se caracterizan por la presencia de sustancias que disminuyen el potencial redox (cisteína, cistina, ác. ascóxico o sulfito de Na), de antibióticos y/o una fuente de carbono sencilla como agentes selectivos para inhibir el crecimiento de otras BAL. Estos medios son enriquecidos frecuentemente con sangre de oveja o caballo (Rasic y Sad, 1990). A menudo también incorporan L-cisteína (0,1-0,5%) para mejorar la recuperación de las bifidobacterias (Teraguchi y col., 1978). La cisteína es un aa azufrado que proporciona N amino como factor de crecimiento mientras reduce el potencial redox, ambos efectos favorecen el crecimiento de las bifidobacterias (Shah, 2000). En muchos casos, el recuento de bajos números de bifidobacterias podría estar sujeto a la interferencia con *S. thermophilus*, produciendo colonias

en puntos (Roy, 2001). En la Tabla 6 se muestran los medios selectivos (por el antibiótico empleado, el hidrato de carbono a fermentar y el pH del medio) para el recuento de bifidobacterias en muestras fecales y en productos lácteos (Hartemink y Rombouts, 1999; Roy, 2001).

**Tabla 6.** Medios de cultivo selectivos para el recuento de bifidobacterias presentes en muestras fecales (MF) y en productos lácteos (PL)

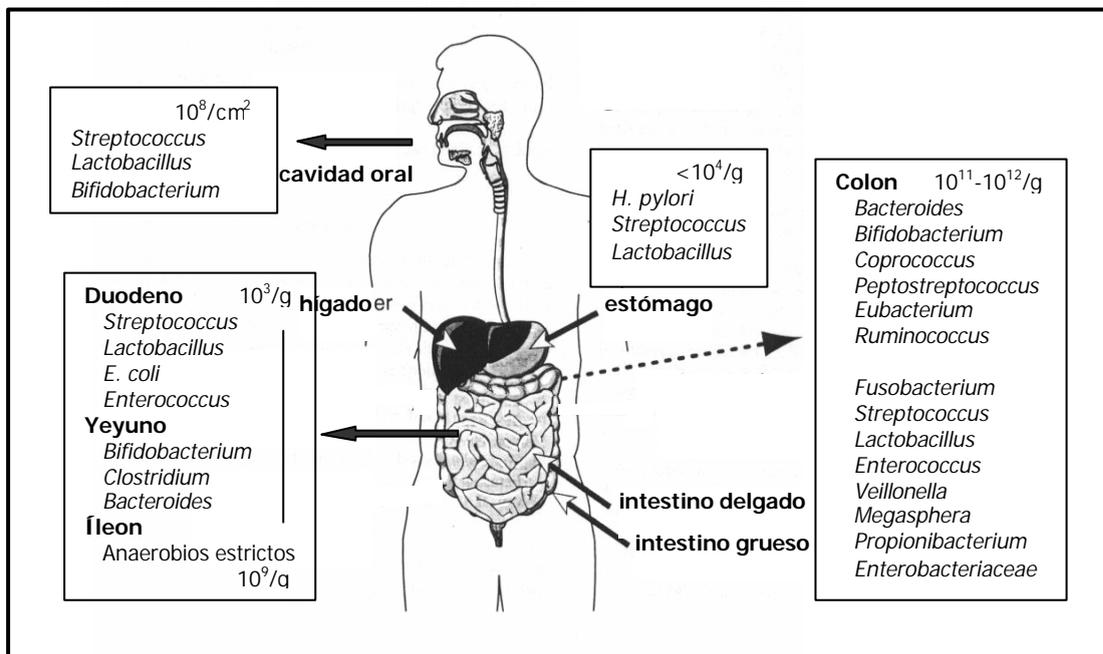
| Medio                          | Selectividad basada en   | Uso   |
|--------------------------------|--|-------|
| AL agar                        | Lactosa, acetilglucosamina   | MF    |
| AMC                            | Ác. nalidixico, polimixina B, ác. iodoacético, TTC (2,3,5-trifeniltetrazolium), mezcla LP (LiCl 2 g/L+propionato Na 3 g/L) | PL    |
| BBM agar                       | Ác. Nalidixico, rifampicina, rafinosa  | MF    |
| BFM                            | LiCl, azul de metileno, ác. propiónico (5 mL)  | PL    |
| BiBL agar                      | Azul de anilina, sangre  | MF    |
| Bif-medium                     | Suero humano, ác. nalidixico, paromomicina, aztreonam, netilmicina   | PL    |
| BIM-25                         | Kanamicina, ác. nalidixico, ác. iodoacético, neomicina, polimixina B, 2,3,5-trifeniltetrazolium cloruro                    | MF/PL |
| BL-OG                          | Oxgall, gentamicina  | PL    |
| BS agar                        | LiCl, neomicina, paromomicina, propionato  | MF    |
| CB agar                        | Color específico del azul china  | MF    |
| DP                             | Dicloxacilina, ác. propiónico (5 mL)   | PL    |
| Ecobion 2                      | Neomicina, LiCl  | PL    |
| GL agar                        | Galactosa, LiCl  | PL    |
| LCL                            | Cisteína, Lactosa  | MF    |
| LP                             | Mezcla LP (LiCl 2 g/L+ propionato Na 3 g/L), lactosa   | PL    |
| mCAB                           | Ác. propiónico (5 mL)  | PL    |
| MPN agar                       | Lactosa, ác. nalidixico  | MF    |
| mRCB                           | Cefalotina, sangre   | MF    |
| MRS-D                          | Dicloxacilina  | PL    |
| MRS-LP agar                    | Ác. propiónico, LiCl   | PL    |
| MRS-NNL                        | LiCl, neomicina, ác. nalidixico  | MF    |
| MRS-NPNL                       | Solución NPNL (neomicina sulfato 100 mg+paromomicina 200 mg +ác. nalidixico 15 mg+LiCl 3 g)                                | PL    |
| mTPY                           | Ác. Acético glacial (1 mL/L), mupirocina (100 mg/L)  | MF    |
| mVF agar                       | LiCl, propionato, neomicina, lauril sulfato Na   | PL    |
| NPNL agar                      | Solución NPNL  | MF/PL |
| Propionate agar (Beerens-agar) | Ác. propiónico, pH 5,0   | MF    |
| RAF 5.1                        | Mezcla LP  | PL    |
| RB                             | LiCl (3 g/L), propionato Na (15 g/L), rafinosa   | MF/PL |
| RCM+tinción                    | Tinción azul de metileno de Loeffler   | PL    |
| RMS+PPNL                       | Propionato Na, neomicina   | PL    |
| Rogosa-N                       | pH bajo, ác. nalidixico  | MF    |
| TCPY                           | Zumo de tomate   | MF    |
| TCPY+azida                     | Zumo de tomate, azida  | MF    |
| TCPY+ác. sórbico               | Zumo de tomate, ác. sórbico  | MF    |
| TCPY+ab                        | Zumo de tomate, ác. sórbico, antibióticos  | MF    |
| TOS agar                       | Transgalactooligosacáridos   | MF/PL |
| TOS-NPNL                       | TOS, Solución NPNL   | PL    |
| TPY-D                          | Dicloxacilina  | PL    |
| TPY-NPNL                       | Solución NPNL  | PL    |
| TTC agar                       | TTC  | MF    |
| YN-6                           | Lactosa, ác. nalidixico, neomicina, verde bromocresol  | MF    |
| X- $\alpha$ -Gal               | X- $\alpha$ -Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactopiranosido)  | MF    |

Adaptado de Hartemink y Rombouts (1999) y Roy (2001)

#### 4. FLORA INTESTINAL HUMANA

El cuerpo humano está formado aproximadamente  $10^{14}$  células, de las cuales el 90% son bacterias y sólo un 10% son de origen mamífero (Sanders y Sanders, 1984). Cada persona alberga unos 100 billones de bacterias de unas 400 especies distintas (Salminen y col., 1998). Más del 95% vive en el tracto digestivo, sobre todo en el colon (Raibaud, 1999).

El tracto GI humano consiste en un gran tubo compuesto por la boca, esófago, estómago, ID e intestino grueso. El ID se puede dividir en duodeno, yeyuno e íleon, y el intestino grueso en ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente y recto (Cummings y Macfarlane, 1991; Macfarlane y Cummings, 1991). En la Figura 1 se muestra la distribución de especies microbiológicas en el tracto GI humano.



**Figura 1.** Distribución de las principales especies bacterianas en el aparato digestivo (adaptado de Hartemink, 1999)

La flora GI ha sido descrita como uno de los ecosistemas bacterianos conocidos más complejos (Drasar y Hill, 1974). Los recuentos totales varían entre las diferentes regiones dentro del tracto GI y dependen principalmente de la tensión de  $\text{O}_2$ , pH y flujo del contenido digestivo. En la cavidad oral, el número de bacterias aproximado es de 7-8 log/g en el hombre y otras especies. Las principales especies son BAL del género *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En la placa dental y en infecciones orales, se han aislado muchas especies anaerobias, principalmente *Prevotella* y *Porphyromonas* (Marsh y Martin, 1992). En el jugo gástrico del hombre hay solo unas 1.000 bacterias por mL debido a la acidez del medio (pH por debajo de 3), mientras que en otras especies como las ratas y los cerdos, los recuentos llegan hasta 7 log/g debido a su mayor pH en el estómago (Hill, 1995). Se sabe que hay

microorganismos que son altamente tolerantes al ácido y que residen en la capa mucosa que yace encima del epitelio gástrico como *Helicobacter pylori* (Rathbone y Heatley, 1992), lactobacilos y estreptococos (Hill, 1995). A lo largo del ID la concentración de bacterias va creciendo desde  $10^4$  bacterias/mL en el duodeno proximal, hasta  $10^7$  bacterias/mL en íleon terminal. La motilidad del ID aclara periódicamente las bacterias de la luz, y las secreciones intestinales tales como las enzimas pancreáticas y variables fisicoquímicas como el pH y el potencial redox, pueden contribuir a que se desarrolle un tipo determinado de microflora (Macfarlane y col., 1995) que coloniza sobre todo las criptas y los recodos ciegos. La parte anterior del ID está dominada por bacterias aerobias y anaerobias facultativas como estreptococos, estafilococos y lactobacilos. En cambio en el colon, el tiempo de tránsito se reduce marcadamente y el pH es más neutro y apropiado para el crecimiento bacteriano, por lo que la población de microorganismos en el colon es mucho mayor y se alcanzan concentraciones de  $10^{11}$ - $10^{12}$  bacterias por mL de contenido (Salminen y col., 1998). Hay un predominio de las especies anaerobias estrictas en relación con las anaerobias facultativas (desde 10:1 hasta 1.000:1) (Nord y Kager, 1984). La inmensa mayoría (más del 90%) de las células totales del cuerpo están presentes como bacterias en el colon, y se piensa que el 60% de la masa fecal pueden ser células procariotas. La microflora del intestino grueso humano se adquiere al nacimiento, y aunque inicialmente dominan las cepas de anaerobios facultativos, la composición de la flora en etapas posteriores del crecimiento responde principalmente a la dieta ingerida (Gibson y McCartney, 1998).

#### **4.1. Adquisición de la microbiota del intestino por los neonatos**

Está admitido de forma general que hasta el momento del nacimiento el feto está rodeado de un ambiente completamente estéril. Tras el nacimiento, el tracto digestivo rápidamente es colonizado por las bacterias (Bezirtzoglou, 1985), aunque no está claro si es a partir de la boca o del recto. La hipótesis de que la colonización se produce a partir de la flora vaginal o fecal de la madre, está basada en la observación de que la invasión del tracto digestivo del neonato ocurre más rápidamente tras el nacimiento por vía genital que por cesárea (Walch, 1956). También se ha observado que los microorganismos tanto del contenido gástrico como de la nasofaringe de los bebés inmediatamente antes del nacimiento son similares a los encontrados en el cervix vaginal de sus madres (Macgregor y Tunnessenn, 1973; Brook y col., 1979). Después del nacimiento, los microbios del ambiente, y los orales y cutáneos de la madre serán transferidos mecánicamente al recién nacido mediante varios procesos incluyendo el amamantamiento, los besos y los cuidados. Así, la proximidad entre el canal del parto y el ano, al igual que los cuidados de los progenitores con el neonato, son métodos efectivos para garantizar la transmisión de los microbios de una generación a otra (Tannock, 1994). Los recién nacidos están también expuestos a nuevos microbios provenientes de la leche materna (hasta  $10^9$  microbios/L) (Moughan y col., 1992). Los géneros más frecuentes son

estafilococos, estreptococos, corynebacterias, lactobacilos, micrococos, propionibacterias y bifidobacterias, ya que todos ellos tienen su origen en el pezón y alrededor de la piel, así como en los conductos galactóforos de la mama (West y col., 1979).

#### 4.2. Desarrollo de la flora intestinal y factores influyentes

El desarrollo de la microbiota intestinal en los niños se puede dividir en cuatro fases separadas (Cooperstock y Zedd, 1983):

1ª Fase: alrededor de la 1ª-2ª semana.

2ª Fase: periodo restante de alimentación a pecho exclusivamente.

3ª Fase: tiempo entre el comienzo de la alimentación complementaria y del cese de la alimentación a pecho.

4ª Fase: periodo de conversión de los patrones de microbiota adulta empezando tras la finalización del destete.

Todos los niños al nacer son colonizados inicialmente por bacterias aerobias y anaerobias facultativas, sobre todo por grandes cantidades de *E. coli*, estreptococos, estafilococos y otras enterobacterias, a menudo alcanzando  $10^8$ - $10^{10}$ /g heces (Bullen y col., 1977; Yoshioka y col., 1991). Estas bacterias son responsables de la creación de un ambiente reducido, favorable para el establecimiento de géneros anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* en los primeros días (Stark y Lee, 1982; Lundequist y col., 1985; Tannock y col., 1990). En los niños alimentados a pecho se reduce el número de *E. coli* y estreptococos, así como los de bacteroides y clostridios, en relación a la microbiota fecal dominada por bifidobacterias. Una vez que comienza la alimentación complementaria, el perfil de bacterias de los niños alimentados a pecho se asemeja a la de los alimentados con fórmula, en los que las bifidobacterias no son el grupo dominante. Durante las fases 3ª y 4ª, tras la introducción de la comida sólida y el destete, parece ocurrir un cambio repentino de la flora, perdiéndose estas diferencias y la microbiota fecal se va asemejando a la de los adultos entre el primer y cuarto año de edad (Stark y Lee, 1982; Cooperstock y Zedd, 1983; Neut y col., 1985a). En algunos niños las bifidobacterias descienden bruscamente, mientras que en otros, se mantienen estables. También se ha observado una marcada proliferación de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* y *Clostridium* (Mitsuoka, 1989). Los números de bacteroides y anaerobios cocos gram-positivos gradualmente se incrementan durante estas dos fases (Cooperstock y Zedd, 1983), existiendo además otros grupos bacterianos (eubacteria, veillonella, estafilococos, propionibacteria, bacilli, fusobacteria y levaduras) que se presentan normalmente en las heces del adulto (Conway, 1997). En la Figura 2 se muestra la evolución de los principales grupos bacterianos durante toda la vida del hombre (Mitsuoka, 1984).

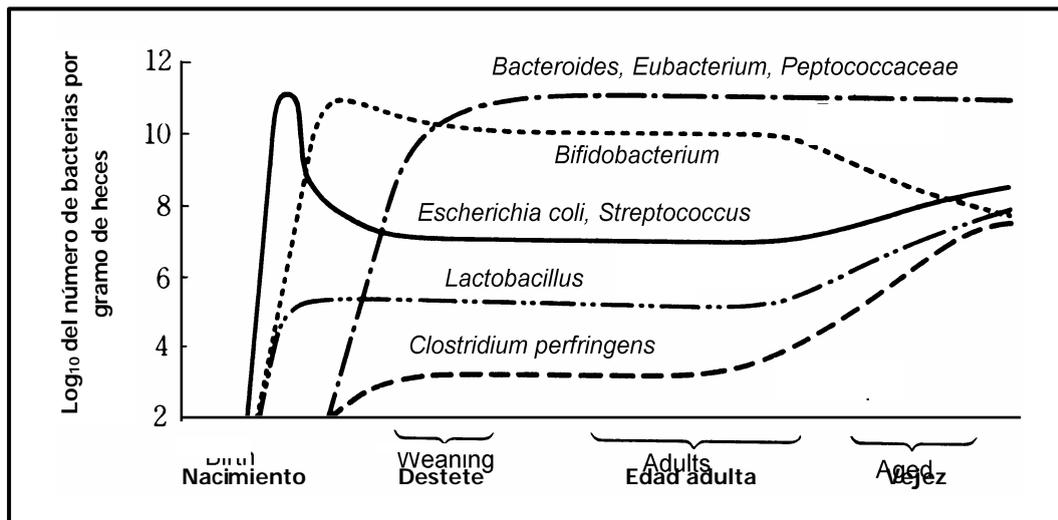


Figura 2. Cambios de la flora intestinal desde el nacimiento hasta la vejez (Mitsuoka, 1984)

El desarrollo de la flora intestinal está influido por numerosos factores que afectan al tipo de especies (incluido el género *Bifidobacterium*) que colonizarán el intestino infantil. A juicio de Mountzouris y col. (2002) los más importantes son los siguientes:

1. La edad de gestación. El nacimiento prematuro es causa de dificultad de implantación de las bifidobacterias por falta de receptores y/o substratos endógenos, mientras que las enterobacterias y bacteroides colonizan fácilmente el colon (Stevenson y col., 1985).
2. El tipo de parto y condiciones ambientales. Tal y como se ha mencionado anteriormente, los niños nacidos por parto vaginal, durante el paso a través del canal del parto, están expuestos a la flora vaginal de la madre (Tannock y col., 1990), aunque la flora del intestino de la madre ha sido reconocida como la fuente más importante de la colonización bacteriana intestinal del recién nacido por parto vaginal (Adlerberth, 1999).

Sin embargo, el ambiente también contribuye en la colonización bacteriana, ya que dentro de las salas de maternidad puede existir una transmisión horizontal de bacterias entre los neonatos a través de las manos del personal médico o de enfermería (Lundequist y col., 1985), especialmente si los bebés son separados de sus madres durante largos periodos de tiempo tras el nacimiento (Murono, y col., 1993) o nacen por cesárea (Fryklund y col., 1992). Las enterobacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* son más frecuentes que *E. coli* en estos neonatos debido su mayor supervivencia en el medio hospitalario (Adlerberth, 1999). Grönlund y col. (1999), encontraron que los niños nacidos por cesárea tienen un mayor rango de colonización de *Clostridium perfringens* que los niños nacidos vaginalmente al mes de edad (57 y 17% respectivamente). Entre todos los niños nacidos por parto vaginal, las bacterias más frecuentes durante los dos primeros meses de vida son las pertenecientes al género *Bifidobacterium* (85-97%), aunque el grupo de *Bacteroides fragilis* es también común (52-79%). Esto demuestra que no existe un patrón claro de colonización, ya que algunos

investigadores han encontrado a las especies pertenecientes al género *Bifidobacterium* como predominantes en el caso de parto vaginal, y *Bacteroides* en un porcentaje más escaso (Stark y Lee, 1982; Yoshioka y col., 1983), mientras que otros autores encontraron el hecho contrario (Simhon y col., 1982; Lundequist y col., 1985).

3. Tipo de alimentación. A principio del siglo pasado, Tissier (1900) describió que la flora del neonato alcanzada con lactancia materna consistía completamente en bifidobacterias, mientras que los lactobacilos eran flora predominante en los alimentados con lactancia artificial. Investigaciones posteriores han demostrado que no hay diferencia cualitativa en la distribución de especies entre estos dos tipos de alimentación, si no que dicha diferencia radica a nivel cuantitativo, es decir en la proporción de bifidobacterias y otras especies (Mitsuoka, 1982; Yuhara y col., 1983; Benno y col., 1984). Numerosos estudios sobre las características de la microflora intestinal en los niños alimentados con lactancia materna, en comparación con los alimentados con lactancia artificial, han demostrado que los primeros poseen una menor cantidad de clostridios y de enterococos, y una mayor cantidad de estafilococos que los niños alimentados con lactancia artificial (Simhon y col., 1982; Yoshioka y col., 1983; Lundequist y col., 1985; Balmer y Wharton, 1989; Tannock, 1994).

En los niños alimentados con lactancia materna existe un predominio de bifidobacterias respecto a las enterobacterias, clostridios y bacteroides en la flora intestinal (Siigur y col., 1993; Langhendries y col., 1995), relacionado con el alto contenido en OS de la leche materna. Éstos estimulan el crecimiento de las bifidobacterias que fermentan la lactosa hasta producir ác. láctico y ác. acético dando lugar a un medio ácido (pH 5-5,5) muy adecuado para su crecimiento y desarrollo (Newburg, 2000). En cambio, los niños alimentados con lactancia artificial desarrollan una flora intestinal más compleja, rica en enterobacterias y bacterias anaerobias gram-negativas (bacteroides), clostridios y estreptococos debido al desarrollo de un medio más alcalino (Gibson y Collins, 1999). Con la lactancia artificial, además se mantienen elevados los niveles de especies aerobias (*E. coli* y estreptococos) que inicialmente colonizan el tracto digestivo y permiten el desarrollo de bacterias anaerobias (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacteria*, *Peptostreptococaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*) (Mitsuoka y Kaneuchi, 1977; Mitsuoka, 1989).

Respecto a la influencia de la alimentación en el tipo de bifidobacteria, se ha encontrado que la especie aislada más frecuentemente y en mayor número es *B. breve* en ambos tipos de lactancia (natural y artificial), y menos frecuentemente y en menor número *B. adolescentis*, *B. longum* y *B. bifidum* (Yuhara y col., 1983; Benno y col., 1984; Mevissen-Verhage y col., 1987). Otros autores han descrito que *B. infantis* es el dominante en los niños alimentados a pecho, con *B. longum* y *B. bifidum* como las siguientes en frecuencia (Mitsuoka y Kaneuchi, 1977; Mitsuoka, 1982; Rasic y Kurmann, 1983). En cambio en otros estudios, *B. bifidum* se mostró como la especie dominante durante la alimentación con lactancia materna (Beerens y col., 1980; Yuhara y col., 1983).

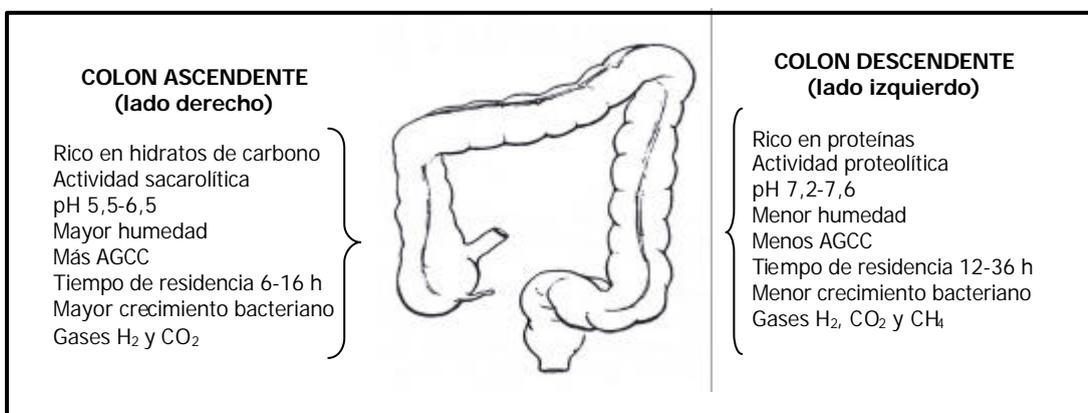
4. Hábitos obstétricos y terapéuticos. Los antibióticos de amplio espectro y otros agentes antimicrobianos, como ungüentos antisépticos utilizados en la palpación vaginal durante el parto, son capaces de provocar importantes alteraciones de la flora autóctona intestinal, con ruptura del equilibrio del ecosistema y un aumento considerable del número de microorganismos resistentes a estos antibióticos (*Pseudomona aeruginosa*, levaduras y *Clostridium difficile*) (Bernasconi, 1986).

### 4.3. El colon humano

Las funciones biológicamente importantes del intestino grueso incluyen la absorción y secreción de ciertos electrolitos y agua, así como el almacenamiento y excreción de materiales de deshecho (Drasar y Hill, 1974; Eastwood, 1982). Además, el intestino grueso es la región más colonizada del tracto digestivo, con más de  $10^{12}$  bacterias por cada gramo de intestino, por lo que esta microbiota residente tiene una función importante en la nutrición y posiblemente en la salud (Gibson y Macfarlane, 1995).

#### 4.3.1. La microflora del colon

Como se ha comentado con anterioridad, en el colon de un adulto humano hay alrededor de 400 especies de bacterias distintas pertenecientes a 50 géneros, siendo las bacterias anaerobias superiores en número a la aerobias, en un rango de 1.000:1 (Moore y Holdeman, 1974; Finegold y col., 1974; Nord y Kager, 1984). Esta comunidad bacteriana alberga a especies pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium* que son numéricamente predominantes (Moore y Holdeman, 1974). Otros grupos cuantitativamente menos importantes son *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, cocos gram-positivos, bacterias metanógenas y sulfato-reductoras (Finegold y col., 1974).



**Figura 3.** Diferencias regionales en la función del intestino grueso humano

Las bacterias tienen actividades fluctuantes en respuesta a la disponibilidad de sustrato, potencial redox, pH, tensión de O<sub>2</sub> y distribución en el colon (Cummings y Macfarlane, 1991). El intestino grueso recibe la digesta del íleon terminal aproximadamente 5 h tras la ingestión (Cummings, 1984). Consecuentemente, los microorganismos residentes en el colon ascendente (lado derecho) tienen un suplemento abundante de nutrientes de la dieta y así crecen más rápido, provocando un descenso del pH (5,5-6,5) como resultado de la intensa actividad sacarolítica y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Sin embargo, en el colon descendente (lado izquierdo) la disponibilidad de sustrato es menor, por lo que las bacterias crecen más lentamente y el pH frecuentemente se aproxima a la neutralidad (7,2-7,6) (Cummings y col., 1987) tal y como se puede apreciar en la Figura 3.

#### **4.3.2. Efectos fisiológicos de la microflora del colon**

Las principales actividades fisiológicas derivadas de la fermentación de los hidratos de carbono no digeribles pueden resumirse en las siguientes:

- Suministro de energía y sustratos nutritivos para las bacterias apoyando su crecimiento y proliferación (Macfarlane y Cummings, 1991).
- Recuperación parcial de la energía de la dieta proporcionada por los sustratos (AGCC, ác. láctico) a la circulación sistémica (Macfarlane y Cummings, 1991).
- Modulación de la proliferación y diferenciación normal y transformada de las células de la mucosa del colon (principalmente a través del ác. butírico). Tal actividad puede jugar un papel importante, tanto en beneficio como en detrimento, de la promoción y progresión de las células neoplásicas en el proceso carcinogénico (van Munster y col., 1994).
- Control del pH del colon, que puede llegar a ser más ácido debido a la producción de ácidos carboxílicos. Tal efecto podría controlarse por la absorción transepitelial de AGCC, que se acompaña de la transferencia intraluminal de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, y por la concentración de Ca en el contenido del colon; a baja concentración se favorece un pH muy ácido y cuando la concentración es elevada el pH no es tan ácido (Macfarlane y Cummings, 1991; Nagengast y col., 1993).
- Absorción incrementada de iones (Ca, Mg y Fe), así como control de la concentración de estos iones en el lumen del colon (Delzenne y col., 1995; Ohta y col., 1995; Lopez y col., 2000).

#### **4.3.3. Bifidobacterias y sus efectos beneficiosos en la salud humana**

Las bifidobacterias producen ácidos orgánicos (acetato y lactato) como productos metabólicos finales de la fermentación de los hidratos de carbono no digeribles que llegan al colon. Como consecuencia se produce un descenso del pH del medio que puede ejercer además

un efecto antibacteriano (Kawase, 1982; Rasic, 1983). Posteriores trabajos han indicado que las bifidobacterias son capaces de excretar un producto metabólico final que es directamente inhibidor de un rango de bacterias patógenas gram-positivas y gram-negativas (Gibson y Wang, 1994a y 1994c). Un efecto añadido a la producción de estos ácidos es la protonación del  $\text{NH}_3$  (y aminas) potencialmente tóxico en forma de  $\text{NH}_4^+$  que no es difundible a sangre, disminuyendo de esta manera los niveles sanguíneos de  $\text{NH}_3$  (Hansen, 1985). Además, estas bacterias no forman otros compuestos tóxicos como aminas alifáticas, ác. sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) o nitritos (Bezkorovainy y Miller-Catchpole, 1989). Las bifidobacterias también producen vitaminas, en gran parte del grupo B, y en especial vitamina  $\text{B}_9$  (Nishizawa, 1960), así como enzimas digestivas como la fosfatasa caseína y lisozima (Kawase, 1982). También se ha descrito que ciertos componentes celulares de las bifidobacterias actúan como “inmunomoduladores”, destacando de entre ellos los que promueven el ataque inmunológico contra células malignas (Sekine y col., 1985). Las bifidobacterias igualmente han sido utilizadas como tratamiento para restablecer la flora normal intestinal que se ve alterada durante la terapia antibiótica (Korshunov y col., 1985). Por último aunque todavía no está totalmente aceptado, las bifidobacterias podrían intervenir en la disminución de los niveles séricos de COL (Tahri y col., 1995, 1997).

#### **4.3.4. Características de la fermentación en el colon humano**

La mucosa del colon es incapaz de alimentarse por sí misma desde la sangre, por lo tanto su nutrición debe ser recibida desde el lumen, donde diferentes nutrientes, AGCC, aa, poliaminas, factores de crecimiento, vitaminas y antioxidantes son producidos por una flora no patógena. Los sustratos para la producción de estos nutrientes consisten principalmente en fibra, almidón resistente y proteínas complejas, pero también se pueden incluir sustancias producidas por el propio hospedador como glucoproteínas (Macfarlane y col., 1989a), células epiteliales exfoliadas, mucus endógeno, bacterias (Wolin y Miller, 1983) y secreciones pancreáticas (Macfarlane y col., 1989a), que son también importantes sustratos para la población bacteriana anaerobia del colon humano. Una característica común de esta “comida para el colon” debe ser el que ningún enzima del ID sea capaz de metabolizarla. Se recomienda que un mínimo del 10% de las calorías ingeridas y alrededor de un 20% del volumen de alimento sea considerado como “comida para el colon” (Bengmark, 2000).

Los principales sustratos para el crecimiento bacteriano son los hidratos de carbono dietéticos o endógenos que escapan de la digestión del tracto GI superior (Cummings y col., 1989; Macfarlane y Cummings, 1991). Entre 10-60 g/día de los hidratos de carbono de la dieta alcanzan el colon (Cummings y Macfarlane, 1991). De ellos se estima que de 8 a 40 g/día lo constituye el almidón resistente que contribuye a una parte importante del sustrato fermentable disponible, seguido de 8-18 g/día de PS no almidón (nomenclatura aceptada para referirse a los polisacáridos diferentes del amidón), 2-10 g/día de azúcares no absorbibles y 2-8

g/día de OS (Van Loo y col., 1995). También hay una contribución de 2-3 g/día de hidratos de carbono endógenos constituidos fundamentalmente por residuos *N*-acetil-D-galactosamina procedentes de los factores sanguíneos. Los géneros bacterianos más conocidos utilizadores de PS en el colon pertenecen al género *Bacteroides* (Macy y Probst, 1979). Otras bacterias capaces de utilizar los hidratos de carbono son especies sacarolíticas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium* (Gibson y Roberfroid, 1995). Además de los hidratos de carbono, las proteínas que escapan a la digestión pueden ser utilizadas para el crecimiento bacteriano (Macfarlane y Cummings, 1991). El género *Bacteroides*, uno de los grupos más numerosos de microorganismos intestinales, puede metabolizar las peptonas, y se cree que algunas cepas utilizan el N elemental para la síntesis de proteínas microbianas (Grütte y col., 1965). Generalmente las bifidobacterias muestran una débil actividad proteolítica (Rasic y Kurmann, 1983), sin embargo se ha comprobado que *B. bifidum* puede dividir las proteínas de la leche en aa.

Los principales productos finales de la fermentación por la microbiota del colon humano son unos pequeños ácidos orgánicos denominados AGCC como el acetato, butirato y propionato (Cummings, 1985; Rechkemmer y col., 1988), producidos por la mayoría de las bacterias sacarolíticas del colon, que metabolizan los hidratos de carbono por la ruta de Embden-Meyerhoff (Wolin y Miller, 1983). En la fermentación también se produce un cierto número de gases incluyendo hidrógeno (H<sub>2</sub>), CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S y metano (CH<sub>4</sub>) (Gibson y col., 1988). Algunos intermediarios de estas oxidaciones anaerobias incluyen etanol y ácidos orgánicos (lactato, succinato y piruvato), que además podrían seguir fermentándose hasta AGCC (Turton y col., 1983). La ruptura oxidativa de los aa por especies proteolíticas da lugar a ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) ó iso-AGCC, tales como isobutirato y isovalerato (Macfarlane y col., 1992). Si los ingredientes no digeribles de la dieta que llegan al colon son principalmente péptidos y proteínas, la fermentación bacteriana, además de producir AGCC y AGCR (Macfarlane y col., 1986), puede dar inicio a actividades menos beneficiosas, como la producción de sustancias potencialmente tóxicas como NH<sub>3</sub>, aminas, fenoles, tioles e indoles (Cummings y Macfarlane, 1991; Macfarlane y Cummings, 1991; Roberfroid y col., 1994). En la Figura 4 se ilustran todos los productos generados por la flora bacteriana del colon humano.

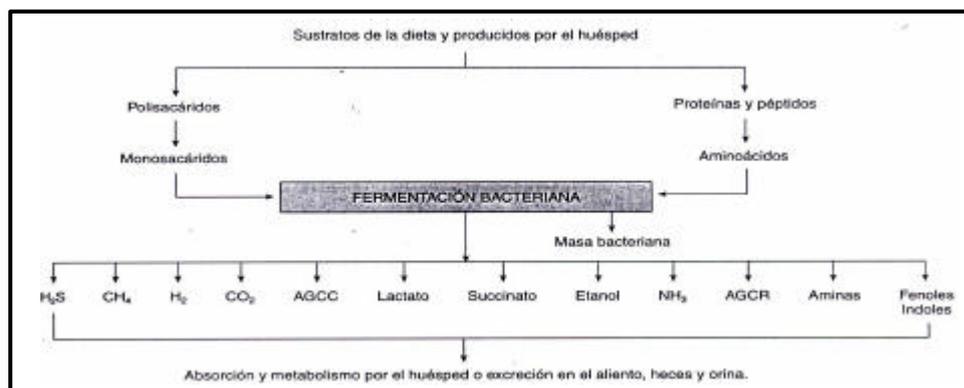
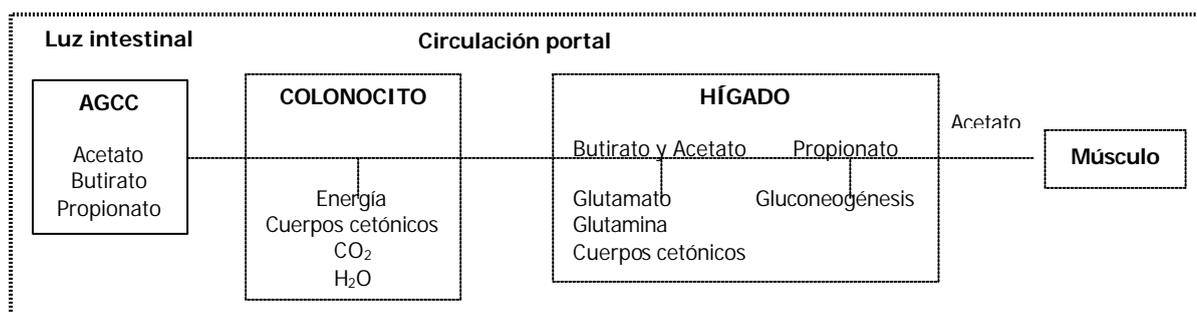


Figura 4. Esquema general de la fermentación por la flora bacteriana del colon

Debido a las fermentaciones de los hidratos de carbono por las bifidobacterias y otras bacterias del colon, los contenidos en esta parte del intestino se vuelven ácidos, convirtiendo el  $\text{NH}_3$  en  $\text{NH}_4^+$ . Este paso sirve para extraer el  $\text{NH}_3$  desde la sangre al colon, y así el  $\text{NH}_4^+$  es excretado por las heces (Bezkorovainy, 2001). Los gases producidos pueden ser expulsados mediante la respiración o flatulencia (Levitt y Ingelfinger, 1968) o, en el caso del  $\text{H}_2$ , además ser utilizado por oxidadores finales tales como las bacterias sulfato-reductoras (Gibson y col., 1988) y metanogénicas (Miller y col., 1982). Los AGCC son los principales productos de la fermentación microbiana de los PS que forman parte de la FD en el colon humano (Wolin y Miller, 1983; Cummings, 1985). En la Figura 5 se representa de forma esquemática la ruta metabólica que sufren los AGCC producidos en la luz intestinal. Éstos son absorbidos en gran cantidad (90-95%) en el ciego y colon ascendente (Ruppin y col., 1980) y metabolizados por las células epiteliales, dando lugar a cuerpos cetónicos (acetoacetato, hidroxibutirato),  $\text{CO}_2$  y agua. Además, el butirato es la principal fuente de energía de las células epiteliales del colon, y a bajas concentraciones puede actuar como regulador de la expresión de genes involucrados en la proliferación y diferenciación de los colonocitos de los mamíferos, así como de las células del carcinoma de colon (Tanaka y col., 1990). En cualquier caso, junto a otros AGCC, una pequeña cantidad del butirato alcanza la circulación portal, y entra en el hígado donde es un precursor de la lipogénesis, y junto al acetato son metabolizados en el hígado dando lugar a los aa glutamato y glutamina, así como a cuerpos cetónicos (Rombeau y Kripke, 1990). El propionato y L-lactato son metabolizados completamente en el hígado, donde el primero es transformado en metilmalonilSCoA y luego en succinilSCoA, y el lactato ejerce de precursor en la gluconeogénesis. Sin embargo, parte del acetato (25-50%) escapa del metabolismo y via circulación sistémica, alcanza los tejidos periféricos, principalmente el músculo (Schumann y col., 1991; Rémésy y col., 1993). El acetato y propionato posiblemente en combinación con L-lactato, también pueden jugar un papel en la regulación del metabolismo lipídico y del COL (Wolever y col., 1991). Así mismo, es de gran importancia la capacidad de los AGCC para estimular la proliferación de la mucosa intestinal, concretamente la del colon (Sakata, 1987). Finalmente, también se ha descrito la capacidad de los AGCC de estimular la absorción de Ca, Mg y Fe en el colon (Delzenne y Roberfroid, 1994). Este último efecto se describe con mayor detalle en el apartado 7.5. de esta sección.



**Figura 5.** Representación esquemática de la formación de AGCC en la fermentación de las bacterias del colon

#### 4.3.5. El colon y la acción de su microbiota en la infancia

Las diferencias fermentativas en los niños se deben principalmente al tipo de alimentación (lactancia materna o artificial) durante los primeros meses de vida. En diferentes estudios (Siigur y col., 1993; Gibson y col., 1995) se ha observado que en los niños alimentados a pecho el ác. acético forma la mayor parte de los AGCC totales en las heces, mientras que en los alimentados a fórmula el propionato y en menor proporción el butirato, presentan mayores ratios molares. Se cree que estas diferencias se deben al hecho de que la leche materna es utilizada mejor por el sistema digestivo del niño, llegando menos compuestos sin absorber al colon y consecuentemente se producen menos AGCC. Sin embargo, los niños alimentados a pecho suelen tener un pH en las heces más ácido, entre 5-6, comparado con el pH más neutro de las heces de los niños alimentados con fórmula, a pesar de que los primeros tengan menor cantidad de AGCC fecales. Una posible explicación es la menor capacidad tamponadora de la leche materna comparada con la fórmula infantil que permite que el contenido intestinal de los niños alimentados con leche se acidifique más fácilmente (Bullen y col., 1977; Rose, 1984). Otro aspecto importante a tener en cuenta como consecuencia de la acción fermentativa de las bacterias del colon es la actividad enzimática que da lugar a componentes con efectos potencialmente tóxicos (Salminen y col., 1998). Grounlund y col. (1999) estudiando en lactantes la actividad de varias enzimas bacterianas durante los 6 primeros meses de vida, encontraron que los niños alimentados con fórmula tenían una actividad ureasa significativamente mayor en los dos primeros meses y  $\beta$ -glucuronidasa a los seis meses de edad.

A pesar de que los neonatos y los niños menores de 3 meses presentan una deficiencia de la actividad  $\alpha$ -amilasa pancreática en el duodeno, se ha observado que lactantes de menos de 6 meses parecen ser capaces de tolerar cantidades moderadas de almidón. Esto se debe a dos enzimas presentes en el borde en cepillo del epitelio duodenal como son la maltasa-glucoamilasa y la amilasa mamaria, involucradas también en la hidrólisis del almidón (Lee, 1983). Además, Lifschitz y col. (1983) mostraron que en los niños alimentados a pecho, la lactosa que escapa a la absorción en el ID fue utilizada completamente en el colon. En un estudio de fermentación *in vitro* de glucosa, lactosa, FOS y SOS por la flora intestinal de lactantes alimentados a pecho o con fórmula, se observó que ambos grupos tenían la misma capacidad de fermentar los azúcares simples y los FOS, pero fueron igualmente pobres en la fermentación de los SOS (Parrett y Edwards, 1997). La capacidad de fermentar *in vitro* los hidratos de carbono complejos por lactantes alimentados a pecho se ha visto que no se desarrolla significativamente hasta el final del destete, tal y como evidenciaron Parrett y col. (1997) mediante un incremento en los niveles de propionato y butirato. La presencia de estos ác. orgánicos indica el desarrollo de una flora más compleja ya que son producidos principalmente por bacteroides y clostridios (Cummings y Macfarlane, 1991). Posiblemente

antes del destete la microflora intestinal del niño está adaptada a la lactosa y a los OS de la leche materna, y por tanto las enzimas para fermentar los hidratos de carbono complejos no están lo suficientemente activas (Parrett y Edwards, 1997). La ingestión continuada de éstos podría ejercer un cambio en la microflora del colon de los niños, incrementándose la habilidad para fermentar estos substratos (Parrett y col., 1997).

## 5. BENEFICIOS DE LA LECHE MATERNA

La industria láctea ha realizado innumerables esfuerzos por alcanzar una adaptación de la composición de las fórmulas infantiles a la de la leche humana, debido a que los niños alimentados con lactancia materna durante el primer año de vida parecen tener una menor incidencia de infecciones gastrointestinales y respiratorias, o éstas son menos severas que las padecidas por los niños alimentados con lactancia artificial, independientemente del grado de desarrollo del país (Cunningham, 1979; Janson y col., 1984). Más recientemente, este efecto protector de la lactancia materna ha sido sugerido también frente a las infecciones del aparato urinario (Pisacane y col., 1992). Además de los componentes inmunológicos, principales responsables de este efecto, hay muchos factores no inmunológicos en la leche humana que se consideran agentes antiinfecciosos para el recién nacido (Goldman y col., 1986). Entre estos hay que destacar una serie de sustancias que por su estructura química actúan como homólogos de los compuestos presentes en la pared celular de los microorganismos patógenos, y que interaccionan con los receptores de las superficies celulares, de esta manera pueden inhibir la unión del patógeno a sus receptores celulares. Entre estas sustancias homólogas se encuentran los glicolípidos, glicoproteínas, mucinas, glicosaminoglicanos y los OS (Newburg, 1997).

Moro en 1900 observó que la leche materna debía de contener un factor de crecimiento para *B. bifidus*. En 1926 se describió que este factor debía de ser una fracción no proteica de la leche humana (Schönfeld, 1926). Posteriormente György y col. (1954) usando un microorganismo mutante llamado *B. bifidum* subespecie *Pennylvanicum*, encontraron que "gynolactose", una mezcla de alrededor de 10 OS, era el factor de promoción del crecimiento de las bifidobacterias. A estos hallazgos hay que sumar los descritos por Kuhn (1958) que demostró que la incorporación de OS de leche humana con N a la leche bovina mejoraron el crecimiento de *B. bifidum* subsp. Penn., efecto debido a la presencia de *N*-acetilglucosamina. Probablemente esto no se deba exclusivamente a la acción de un único factor de la leche humana, sino más bien una compleja interacción de factores (Heine y col., 1992) entre los que cabe destacar:

1. Los oligosacáridos, incluyendo a *N*-acetilglucosamina, el elevado contenido en lactosa, así como la presencia de otros azúcares tales como glucosa, galactosa y fucosa (György, 1953; Gauhe y col., 1954).

2. El bajo contenido en proteínas y minerales, y la reducida capacidad tamponadora de la leche humana pueden permitir elevar el crecimiento de bifidobacterias (Willis y col., 1973; Bullen y col., 1977).
3. Ciertos compuestos, incluyendo la lactoferrina (Law y Reiter, 1977) y ciertos lípidos inhiben el crecimiento de algunos microorganismos (Raibaud, 1988). La concentración de lactoferrina en la leche materna es diez veces mayor que en la leche de vaca y sobrevive al paso por el tracto GI de los niños (Spik y col., 1982), pudiendo ejercer su actividad antimicrobiana al restringir el Fe a las bacterias (Griffiths, 1987). Pero podría tener algún papel como donador de Fe a las bifidobacterias ya que éstas lo necesitan para su crecimiento (Miller-Catchpole y col., 1997).
4. Ciertas bacterias pueden estimular la producción de inmunoglobulinas tales como la Ig A secretoria.
5. Los nucleótidos también pueden ser factores de crecimiento específicos para las bifidobacterias (Gil y col., 1986; Balmer y col., 1994).

Todos estos hallazgos han motivado que se lleven a cabo muchos intentos por mejorar las fórmulas infantiles con el fin de inducir una colonización lo más parecida a la encontrada en los niños alimentados con lactancia materna. Estos intentos han incluido el enriquecimiento con lactosa para alcanzar los niveles de la leche humana, la adición de almidón, lactoferrina o nucleótidos, la reducción del contenido graso y la búsqueda de un ratio proteico óptimo caseína:suero (Stark y Lee, 1982; Simhon y col., 1982; Yoshioka y col., 1983; Lundquist y col., 1985; Balmer y col., 1994; Kleessen y col., 1995). Además, la influencia del calentamiento durante el procesado de la leche de vaca se sabe que convierte parcialmente la lactosa en lactulosa, un isómero del anterior que tras atravesar el ID sin ser degradado podría promover el crecimiento bacteriano (Heine y col., 1992; Brommage y col., 1993).

### **5.1. Oligosacáridos no digeribles (OND) de la leche humana**

Entre los mamíferos, la leche humana es la que posee la mayor cantidad de OS complejos (5-8 g/L), y aparte de la leche de elefanta, ninguna otra leche de mamífero analizada hasta la fecha tiene cantidades comparables de OS fucosilados complejos (Kunz y col., 1999). Diversos estudios han cuantificado la concentración de OS en 20-23 g/L en el calostro y 12-14 g/L en la leche madura (Viverge y col., 1985; Coppa y col., 1993). Desde un punto de vista cuantitativo representan el tercer componente en la leche humana después de la lactosa (60 g/L) y los lípidos (39 g/L) (Newburg y Neubauer, 1995). Este dato es importante si se tiene en cuenta que los monosacáridos constituyen sólo el 1% (0,5-1,0 g/L) del total de hidratos de carbono (Coppa y col., 1993), y el contenido en proteína es de 10-12 g/L (Egge y col., 1983).

Desde un punto de vista bioquímico, los OND son el resultado de la adición secuencial de monosacáridos a la molécula de lactosa por glicosiltransferasas específicas de la glándula

mamaria (Egge, 1993). En particular, las unidades de monosacárido están representadas por fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico (ác. siálico) que se unen formando estructuras lineales o ramificadas. Todos los OS suelen tener un resto de lactosa en el extremo reducido y con frecuencia contienen una molécula de fucosa y/o ác. siálico en el extremo no reducido. La mayoría de los OS de la leche están compuestos por moléculas con 3-9 unidades de monosacárido (Coppa y col., 1991). Estos componentes se combinan de diferente forma (Tabla 7) para dar lugar a los 130 OS que se han identificado (Sabharwal y col., 1991), que en base a su composición química se clasifican en:

- 1- Oligosacáridos “núcleo” (OS-núcleo), formados por glucosamina, galactosa y N-acetilglucosamina, representando las estructuras originarias para la síntesis de OS más complejos.
- 2- Fucosil-Oligosacáridos (Fucosil-OS), derivados de la adición a los anteriores de una o más moléculas de fucosa.
- 3- Sialil-Oligosacáridos (Sialil-OS), resultantes de la adición a los primeros de una o más moléculas de ác. siálico.
- 4- Sialil-fucosil-Oligosacáridos (Sialil-fucosil-OS), que contienen tanto fucosa como ác. siálico.

**Tabla 7.** Oligosacáridos de la leche humana

| <b>Oligosacáridos “núcleo”</b>             |                             |
|--|-----------------------------|
| Lacto-N-hexaosa                            | Lacto-N-neo-tetraosa        |
| Lacto-N-neo-hexaosa                        | Lacto-N-octaosa             |
| Lacto-N-neo-hexaosa                        | Lacto-N-tetraosa            |
| Lacto-N-neo-octaosa                        |                             |
| <b>Fucosil-Oligosacáridos</b>              |                             |
| 2'-fucosil-lactosa                         | Lacto-N-difuco-hexaosa II   |
| 3'-fucosil-lactosa                         | Lacto-N-fuco-pentaosa I     |
| Difucosil-lacto-N-hexaosa                  | Lacto-N-fuco-pentaosa II    |
| Difucosil-lacto-N-hexaosa b                | Lacto-N-fuco-pentaosa III   |
| Difucosil-lacto-N-hexaosa I                | Lacto-N-fuco-pentaosa V     |
| Difucosil-lactosa                          | Monofucosil-lacto-N-hexaosa |
| Lacto-N-difuco-hexaosa I                   | Trifucosil-lacto-N-hexaosa  |
| <b>Sialil-Oligosacáridos</b>               |                             |
| 3'-sialil-lactosa                          | Sialil-lacto-N-tetraosa a   |
| 6'-sialil-lactosa                          | Sialil-lacto-N-tetraosa b   |
| Disialil-lacto-N-tetraosa                  | Sialil-lacto-N-tetraosa c   |
| Monofucosil-monosialil-lacto-N-neo-hexaosa |                             |
| <b>Sialil-fucosil-Oligosacáridos</b>       |                             |
| 3'-sialil-3-fucosil-lactosa                |                             |
| Sialil-fucosil-lacto-N-tetraosa I          |                             |
| Sialil-fucosil-lacto-N-tetraosa II         |                             |

Adaptado de Kunz y Rudloff (1993) y Coppa y col. (1999)

La composición de OS de la leche materna presenta variaciones durante la lactación. Los fucosil-OS, la 2'-fucosil-lactosa, difucosil-lacto-N-hexaosa y trifucosil-lacto-N-hexaosa representan entre el 60-70% de este grupo, presentando un progresivo descenso del 20%

durante el primer mes de lactación, sin variaciones significativas hasta el tercer mes. Entre los OS-núcleo, la lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa representan el 90%, con una reducción gradual durante los 30 primeros días, para luego incrementarse hasta el día 60 y 90 respectivamente, y ser similares al calostro. En los sialil-OS, la sialil-lacto-N-tetraosa c, 6'-sialil-lactosa y disialil-lacto-N-tetraosa, se reducen con el tiempo de forma que al día 90 representan el 50% del calostro (Coppa y col., 1999). De forma general, la mayor concentración se produce en el día 4 (20 g/L), descienden un 10% en el día 10 y otro 10% al día 30, luego permanecen constantes hasta el final del tercer mes. Esta concentración decreciente de los OS durante las primeras semanas de lactancia está asociada con un incremento en la maduración del sistema inmunológico del niño (Miller y col., 1994).

Hay estudios que han probado que las heces de los niños alimentados a pecho tienen un patrón de OS con un mínimo de similitud del 40% al presente en la leche humana (Coppa y col., 2001). Estos datos han llevado a sugerir que probablemente un 60% de los OS ingeridos por el niño sean parcialmente metabolizados por la flora intestinal, y posteriormente son parcialmente absorbidos tal y como se encuentran, o tras su degradación a unidades de monosacáridos por las glicohidrolasas específicas de la leche (Coppa y col., 1987).

Los OS de la leche no sólo mejoran el crecimiento de la flora bifidogénica (Gyorgy y col., 1954), sino también juegan un papel importante en la defensa frente a varios patógenos como anteriormente se ha comentado. Las superficies celulares contienen un gran número de glucolípidos y glucoproteínas que funcionan en la comunicación intracelular y como receptores específicos extracelulares para muchos patógenos en el duodeno (*E. coli*, *C. jejuni*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp.) (Beachey, 1981). Debido a que los OS de la leche parecen ser sintetizados por glucotransferasas similares a aquellas que sintetizan las glucoproteínas y glucolípidos de los componentes de las superficies celulares (Kobata 1978), es razonable asumir que algunos de estos OS podrían tener estructura homóloga a los hidratos de carbono superficiales. Estos podrían actuar como análogos u homólogos de los receptores celulares superficiales de los patógenos, y por lo tanto inhibiendo la habilidad del patógeno para unirse al glucoconjugado homólogo de la superficie celular. Como el estómago de los niños no es tan ácido como el de los adultos y su sistema inmune no está del todo desarrollado, este mecanismo actúa como una protección adicional frente a los patógenos entéricos.

Se ha observado que los fucosil-OS previenen la adhesión de *E. coli* enteropatógena y uropatógena (Cravioto y col., 1991) y de *Candida albicans* a la superficie de la mucosa intestinal (Brassart y col., 1991), los nucleo-OS inhibe la unión de *S. pneumoniae* (Andersson y col., 1986), y los sialil-OS frente a *H. pylori* (Evans y col., 1988), *E. coli* S-fimbriado y virus de la influenza (Zopf y Roth, 1996).

La función protectora de la leche humana también se ha descrito sobre las vías respiratorias altas, frente a las otitis medias en recién nacidos, causadas en el 70% de los casos por pneumococos o *Haemophilus influenzae* sp. (Anderson y col., 1986), y en el aparato urinario (Coppa y col., 1990). Chester y col. (1981) mediante un análisis de la orina de niños

alimentados a pecho y con fórmula detectaron la presencia de 2'- y 3'-fucosil-lactosa y difucosil-lactosa únicamente en los niños alimentados a pecho. Los fucosil-OS estaban prácticamente ausentes en la orina de niños alimentados con fórmula, mientras que los componentes sialilados estaban en ambos grupos. Rudloff y col. (1996) también encontraron mayores cantidades de OS de la leche materna (lacto-N-tetraosa, lacto-N-fuco-pentaosa I y II, y difucosil-lacto-N-hexaosa) en la orina de niños alimentados con lactancia materna que en los alimentados con fórmula. Otros factores como un incremento local de la producción de Ig A en el tracto urinario de los niños alimentados a pecho (Goldblum y col., 1989) o la excreción de lactoferrina materna (Goldman y col., 1990) pueden también inhibir la adhesión bacteriana a las células epiteliales a este nivel.

Los OS de la dieta podrían también jugar un papel destacable en el desarrollo del cerebro, concretamente en la síntesis de glucoproteínas cerebrales y glucolípidos (Carlson, 1985). Aproximadamente la mitad de los OS presentes en la leche humana son sialil-OS (Sabharwal y col., 1991). En ratas el descenso de las concentraciones de ác. siálico, de gangliósidos y glicoproteínas del cerebro y cerebelo estuvo asociado con un empeoramiento irreversible en el comportamiento de aprendizaje en la rata (Morgan y Winick, 1980). Aunque el hígado infantil puede sintetizar ác. siálico, no tiene la capacidad para cubrir completamente los requerimientos durante el periodo postnatal más temprano (Morgan y Winick, 1980). La elevada concentración de ác. siálico asociado en la leche humana durante la primera semana de lactación (1.200 mg/L), coincide con una etapa de rápida síntesis de sialoglicoproteínas y gangliosidos del cerebro (Morgan y Winick, 1980). Sin embargo, al final del tercer mes de lactación, el ác. siálico ha descendido 3 veces. Algunos trabajos han sugerido que los recién nacidos poseen una enzima intestinal sialidasa que incrementa su actividad durante la maduración del intestino (Sabharwal y col., 1991). Estas investigaciones podrían explicar el hecho de que los niños alimentados con lactancia materna poseen mayor puntuación en test de inteligencia que los alimentados con lactancia artificial (Lucas y col., 1992).

## 6. PROBIÓTICOS

### 6.1. Definición y evolución del término probiótico

El término *probiótico* proviene del griego (pro, "para," y bios, "vida"). Su significado ha ido cambiando con el paso del tiempo. Metchnikoff en 1907 fue el primero en sugerir que las bacterias ingeridas, en forma de yoghurt y otros alimentos fermentados, podrían afectar beneficiosamente a la flora normal intestinal (Metchnikoff, 1907). Pero no fue hasta 1965 cuando Lilly y Stillwell emplearon el término probiótico por primera vez para describir "sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro", y así fue propuesto como antónimo al término *antibiótico*. En 1971 Sperti aplicó el término a "extractos de tejidos que estimulaban el crecimiento microbiano". Parker (1974) fue el primero en utilizar el término *probiótico* en el sentido que se hace actualmente. Él definió los probióticos como "organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal". Debido a que esta definición resultó ser muy amplia y podía abarcar desde preparaciones diseñadas específicamente para ejercer efectos beneficiosos sobre el crecimiento y salud animal hasta los yogures y leches fermentadas, incluso pasando por los antibióticos, Fuller en 1989 intentó mejorar la definición de probiótico de Parker con la siguiente diferenciación: "Un suplemento o alimento microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal hospedador mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal". Sin embargo, esta definición está restringida al consumo de suplementos alimenticios, a los animales como hospedador, y a la flora del tracto intestinal como único órgano diana. Así, en 1992 Havenaar y Huis in't Ved ampliaron la definición con respecto al hospedador y al hábitat de la microflora en los siguientes términos: "Un cultivo único o mixto de microorganismos viables, que aplicados a los animales o al hombre afecta beneficiosamente al hospedador mediante la mejora de las propiedades de la microflora autóctona". Para Salminen (1996) y Schaafsma (1996) el probiótico es "un cultivo microbiano vivo o producto lácteo cultivado, que influye beneficiosamente sobre la salud y nutrición del hospedador". Sin embargo, Schrezenmeir y de Verse (2001) propusieron la siguiente definición como la más cercana al término *probiótico* dada por Havenaar y Huis in't Ved (1992): "Una preparación de un producto que contiene microorganismos viables y definidos en número suficiente, que altera la microflora (mediante implantación o colonización) en un compartimiento del hospedador y ejerce efectos beneficiosos sobre la salud en el hospedador".

### 6.2. Criterios que deben cumplir los probióticos

Para que las bacterias seleccionadas como probióticos puedan proporcionar beneficios saludables y clínicos deben de cumplir una serie de requisitos. Klaenhammer y Kullen (1999) recopilaron y clasificaron los requisitos descritos en la bibliografía científica en cuatro grupos como muestra la siguiente tabla.

**Tabla 8.** Selección de criterios para las cepas probióticas

|   |
|---|
| <b>Idoneidad</b>  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Identificación taxonómica precisa</li><li>• Habitantes normales de las especies objetivo: de origen humano para los probióticos humanos</li><li>• No tóxicos, ni patógenos y con estatus GRAS (Generally Recognized As Safe, reconocidos generalmente como seguros)</li></ul>   |
| <b>Aplicabilidad tecnológica</b>  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Adecuado en la producción en masa y almacenamiento: buen crecimiento, recuperación, concentración, congelación, deshidratación y distribución</li><li>• Viabilidad en elevadas poblaciones (preferentemente <math>10^6</math>-<math>10^8</math>)</li><li>• Estabilidad de las características deseadas durante la preparación, almacenamiento y entrega del cultivo</li><li>• Capacidad de proporcionar cualidades organolépticas deseables cuando se incluyan en los alimentos o procesos de fermentación</li><li>• Genéticamente estable</li><li>• Genéticamente adecuado</li></ul> |
| <b>Competitividad</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Capaz de sobrevivir, proliferar, y actividad metabólica en el lugar diana <i>in vivo</i></li><li>• Resistente a la bilis</li><li>• Resistente a los ácidos</li><li>• Capaz de competir con la microflora normal, incluyendo las mismas especies o las más cercanamente relacionadas, potencialmente resistente a las bacteriocinas, ácidos y otros antimicrobianos producidos por la microflora residente</li><li>• Preferentemente con potencial de adherencia y colonización</li></ul>  |
| <b>Rendimiento y funcionalidad</b>  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Capaz de ejercer uno o más beneficios para la salud clínicamente documentados</li><li>• Antagonistas hacia las bacterias patógenas/carcinogénicas</li><li>• Producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos u otros componentes inhibitorios)</li><li>• Inmunoestimulatorios</li><li>• Antimutagénicos</li><li>• Anticarcinógenos</li><li>• Producción de compuestos bioactivos (enzimas, anticuerpos, péptidos)</li></ul>   |

Adaptado de Klaenhammer y Kullen (1999)

Sin embargo, los criterios situados en los apartados *competitividad* y *rendimiento* permanecen bajo controversia, ya que los mecanismos subyacentes por los cuales los probióticos ejercen su papel funcional *in vivo* no están descritos totalmente. Tres excelentes ejemplos son:

- 1- Tolerancia a la bilis y a la actividad hidrolasa de las sales biliares. Los probióticos varían considerablemente sus niveles de tolerancia a la bilis, y el nivel mínimo aceptable para un candidato permanece todavía sin conocerse (Tannock, 1998).
- 2- Actividad adyuvante e inmunoestimulación. Hay mucha información sobre el incremento de los niveles de los anticuerpos IgA e IgM (Tannock, 1998). No obstante, estas propiedades son muy variables entre las cepas y falta por determinar qué características de la célula o de su superficie es la responsable de ejercer estos efectos.

- 3- Antimicrobianos. No se ha descrito ningún probiótico de los que han sido propuestos con efectos inhibitorios *in vivo* (Bernet-Camard y col., 1997; Hudault y col., 1997). Así, queda por investigar si estos compuestos son producidos en el intestino o tienen propiedad funcional (Klaenhammer y Kullen, 1999).

### 6.3. Microorganismos utilizados comúnmente como probióticos

A pesar de que no existan criterios ampliamente aceptados sobre determinadas características que deben reunir un microorganismo para ser considerado como probiótico, algunos de los más comúnmente usados para promover la salud y la nutrición animal incluyen cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, y mohos de los géneros *Saccharomyces*, *Aspergillus* y *Torulopsis* (Tannock, 1997). En el desarrollo de los alimentos probióticos propuestos para el consumo humano, las cepas de las BAL, tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, han sido las usadas más comúnmente, debido al hecho de que son bacterias deseables de la microflora intestinal (Berg, 1998). Las principales especies de BAL empleadas como probióticos humanos (Collins y col., 1998; Kopp-Hoolihan, 2001; Holzapfel y col., 2001) se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Especies bacterianas empleadas como probióticos

|  |                      |
|--|----------------------|
| <b>Género <i>Lactobacillus</i></b>       |                      |
| <i>L. acidophilus</i>                    | <i>L. johnsonii</i>  |
| <i>L. amylovorus</i>                     | <i>L. lactis</i>     |
| <i>L. casei</i>                          | <i>L. paracasei</i>  |
| <i>L. crispatus</i>                      | <i>L. plantarum</i>  |
| <i>L. fermentum</i>                      | <i>L. reuteri</i>    |
| <i>L. gallinarum</i>                     | <i>L. rhamnosus</i>  |
| <i>L. gasseri</i>                        | <i>L. salivarius</i> |
| <b>Género <i>Bifidobacterium</i></b>     |                      |
| <i>B. adolescentis</i>                   | <i>B. infantis</i>   |
| <i>B. animalis</i>                       | <i>B. lactis</i>     |
| <i>B. bifidum</i>                        | <i>B. longum</i>     |
| <i>B. breve</i>                          |                      |
| <b>Género <i>Streptococcus</i></b>       |                      |
| <i>S. lactis</i>                         |                      |
| <i>S. salivaris</i>                      |                      |
| <i>S. thermophilus</i>                   |                      |
| <b>Otras BAL</b>                         |                      |
| <i>Enterococcus faecium</i>              |                      |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i>         |                      |
| <b>Bacterias no ácido-lácticas</b>       |                      |
| <i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> |                      |
| <i>Propionibacterium fredenreichii</i>   |                      |
| <i>Saccharomyces boulardii</i>           |                      |

#### **6.4. Valoración *in vitro* de cepas bacterianas como potenciales probióticos**

Varios grupos de investigación han recomendado que la valoración de microorganismos como potenciales probióticos debe incluir principalmente la estimación de la resistencia de la acidez gástrica y toxicidad biliar, capacidad de adhesión al tejido epitelial del intestino, la habilidad para colonizar el tracto GI, la producción de sustancias antimicrobianas y su habilidad para modular las respuestas inmunes (Marteau y Rambaud, 1993; Salminen y col., 1996; Tannock, 1997; Guarner y Schaafsma, 1998; Brassart y col., 1998; Collins y col., 1998). Estas características van a ser desarrolladas a continuación con más detalle.

##### **6.4.1. Resistencia a la acidez gástrica**

Antes de alcanzar el tracto GI, las bacterias probióticas deben sobrevivir al tránsito a través del estómago (Henriksson y col., 1999), donde la secreción del ác. gástrico constituye la primera defensa contra la mayoría de los microorganismos ingeridos. En un estudio *in vitro* fueron usadas seis cepas de *L. acidophilus* y nueve cepas del género *Bifidobacterium*, manteniéndose a pH 1,5-3 durante menos de 3 h. Se pudo observar que la viabilidad dependió del pH, el tiempo de exposición al ácido, y de las especies y cepas usadas. Los organismos más resistentes fueron *L. acidophilus* 2401, 2409 y 2415, *B. longum* 1941, y *B. pseudolongum* 20099, en el rango de pH citado a lo largo del tiempo de ensayo (Lankaputhra y Shah, 1995).

##### **6.4.2. Resistencia a los ácidos biliares**

Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado a partir del COL y se secretan de la vesícula biliar al duodeno en forma conjugada pudiendo sufrir modificaciones químicas en el colon (deconjugación) (Hoffman y col., 1983). Los ácidos biliares, tanto conjugados como deconjugados, exhiben actividad antibacteriana inhibiendo *in vitro* el crecimiento de *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterococcus* spp. (Lewis y Gorbach, 1972), y se ha visto que las bacterias gram-positivas son más sensibles que las gram-negativas a este efecto (Floch y col., 1972). En estudios *in vitro* para evaluar la supervivencia de las cepas de lactobacilos y bifidobacterias se mantuvieron a concentraciones biliares de 0-1,5% durante menos de 3 h. La supervivencia varió entre las diferentes cepas y dependió de la concentración de bilis y los tiempos de exposición. Entre las bifidobacterias, *B. longum* 1941, *B. infantis* 1912 y *B. pseudolongum* 20099 fueron las más resistentes, mientras que entre los lactobacilos las cepas 2402 y 2415 de *L. acidophilus* fueron las más resistentes (Lankaputhra y Shah, 1995). También se puede evaluar el crecimiento bacteriano en presencia de sales biliares mediante la aparición de ácidos biliares deconjugados en el medio de cultivo. Las sales biliares deconjugadas, que son mejores agentes lisantes que los ácidos biliares conjugados, se obtienen por la acción de las hidrolasas de sales biliares presentes tanto en lactobacilos como bifidobacterias. Gopal y col. (1996)

observaron que *L. acidophilus* 2405 y 2401 fueron los más resistentes (sales biliares conjugadas) con oxgall al 0,3% entre los lactobacilos, mientras que *B. infantis* 1912 y *B. adolescentis* 1920 lo fueron entre las bifidobacterias.

#### **6.4.3. Adherencia de los aislados bacterianos del íleon a las líneas celulares humanas**

Está generalmente aceptado que para que una cepa bacteriana se establezca permanentemente en el intestino del hospedador, el microorganismo debe ser capaz de adherirse a las células de la mucosa intestinal (O'Sullivan y col., 1992).

Este efecto ha sido probado utilizando líneas celulares intestinales humanas que expresan características fisiológicas y morfológicas de los enterocitos normales humanos (células HT-29 y Caco-2) (Brassart y col., 1998), y que han servido para comprender los mecanismos que median en la adhesión de enteropatógenos (Coconnier y col., 1993; Bernet y col., 1994). Estas líneas celulares se han usado igualmente para seleccionar, y consecuentemente evaluar las BAL en base a sus propiedades de adhesión (Crociani y col., 1995; Tuomola y Salminen, 1998). Sin embargo, las evidencias disponibles actualmente sugieren que esto no ocurre *in vivo*. Por ejemplo, Bouhnik y col. (1992) observaron que aunque el porcentaje de recuperación de la cepa de bifidobacterias administrada fue de  $29,7 \pm 6\%$  de la dosis ingerida en heces de voluntarios alimentados con bifidobacterias, cuando se detuvo la administración de esta cepa, no se recuperó más en las heces. Estos autores concluyeron que la administración de bifidobacterias parece que no coloniza el colon humano. Kullen y col. (1997) en otro estudio indicaron que aunque las bifidobacterias puede sobrevivir al paso a través del tracto GI, no lo colonizan en una proporción significativa, y que la colonización podría ser innecesaria para alcanzar resultados positivos en la terapia con probióticos.

#### **6.5. Efectos de los probióticos**

La OMS recomendó una reducción inmediata y drástica del uso de antibióticos en la producción animal (animales de renta y pescado) y vegetal, y en medicina humana (FAO, 1994). No obstante, la OMS ha recomendado una segunda táctica o terapia de interferencia microbiana basada en el uso de microorganismos no patógenos para eliminar a los que sí lo son como un complemento al cese en el uso de los antibióticos. Es aquí donde entran en acción los probióticos, aunque a éstos se les han sugerido muchos más efectos sobre la salud que los meramente descritos anteriormente.

En la Tabla 10 se muestran los efectos de los probióticos sobre el sistema digestivo recogidos en la bibliografía científica (Rofe, 2000; Bezkorovainy, 2001; Dunne y col., 2001; Floch y Hong-Curtiss, 2001).

**Tabla 10.** Efectos de probióticos descritos sobre el sistema digestivo

| Cepa bacteriana  | Efectos descritos en estudios clínicos   |
|--|--|
| <i>L. acidophilus</i> LC1  | Estimulación del sistema inmune, adjuvante de vacunas, adherencia al intestino humano, equilibrio de la microflora intestinal  |
| <i>L. acidophilus</i> NCFO 1748  | Descenso de las enzimas fecales, prevención de la diarrea relacionada con radioterapia, tratamiento del estreñimiento  |
| <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. casei</i> GG                            | Prevención de la diarrea asociada a antibióticos, tratamiento y prevención de la diarrea por rotavirus, tratamiento de la recaída en la diarrea de <i>C. difficile</i> , prevención de la diarrea aguda causada por <i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp., alivio de la enfermedad de Crohn, antagonista contra bacterias carcinogénicas, efectivo en el tratamiento de la pouchitis |
| <i>L. casei</i> Shirota  | Prevención de alteraciones intestinales, equilibrio de bacterias intestinales, descenso de las enzimas fecales   |
| <i>L. gasseri</i>  | Reducción de las enzimas fecales, supervivencia en el tracto gastrointestinal  |
| <i>B. bifidum</i>  | Tratamiento de la diarrea por rotavirus, equilibrio de la microflora intestinal, tratamiento de la diarrea por <i>C. difficile</i>   |
| <i>S. boulardii</i>  | Prevención de la diarrea del viajero, prevención y tratamiento de la diarrea <i>C. difficile</i> , y de la diarrea asociada a antibióticos, tratamiento de la diarrea crónica por el virus HIV, descenso de la diarrea por alimentación parenteral   |
| <i>B. longum</i> + <i>L. acidophilus</i>                               | Reducción significativa de la disbiosis gastrointestinal   |
| <i>L. acidophilus</i> NFCM   | Tratamiento de la intolerancia a la lactosa, producción de bacteriocinas, descenso de la actividad enzimática, elevada actividad lactasa   |
| <i>L. reuteri</i>  | Colonización del tracto gastrointestinal, acortamiento de la diarrea asociada a antibióticos   |
| <i>Lactobacillus</i> + <i>Bifidobacterium</i> + <i>S. thermophilus</i> | Desciende la reincidencia de la pouchitis, tratamiento de la intolerancia a la lactosa   |
| <i>Lactobacillus</i>   | En ratones gnotobióticos y en estudios <i>in vitro</i> antagonista de la gastritis crónica y úlcera gástrica y duodenal por <i>H. pylori</i>   |
| <i>L. acidophilus</i> + neomicina                                      | Tratamiento de la encefalopatía hepática por descenso de la actividad ureasa fecal   |
| <i>L. plantarum</i> + <i>L. GG</i>                                     | Eliminación de los síntomas por el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado   |
| <i>B. infantis</i>   | Inmunomodulador contra células malignas, restauración de la flora intestinal tras una terapia antibiótica  |

Los mecanismos de acción de los probióticos descritos en el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales son los siguientes:

1. Producción de sustancias inhibitorias frente a gram-positivos y gram-negativos, e incluyen ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y bacteriocinas. De todas ellas destaca la nisina, producida por algunas subespecies de *L. lactis* (Jack y col., 1995), que afecta al metabolismo o producción de toxinas de las bacterias causantes de la afección GI (Gibson y Wang, 1994c).
2. Bloqueo de los nichos de adhesión de los patógenos en la superficie de las células epiteliales mediante un mecanismo de inhibición competitiva de los mismos (Goldin y col., 1992; Fujiwara y col., 1997).
3. Competición por los nutrientes, ya que los probióticos pueden utilizar nutrientes que en caso contrario serían consumidos por los microorganismos patógenos.

4. Degradación del receptor del tóxico. Es el mecanismo utilizado por *S. boulardii* contra *C. difficile* (Castagliuolo y col., 1999).
5. Estimulación de la inmunidad específica o inespecífica (Kaila y col., 1992; Fukushima y col., 1998). La administración oral de *L. GG* durante la diarrea aguda por rotavirus se asocia con una mejora de la respuesta inmune (Kaila y col., 1992).

Ciertos probióticos como los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han demostrado su efecto en aspectos selectivos de la función inmune, que puede afectar a uno o varios componentes de la respuesta inmune (inmunidad humoral, celular o no específica). En la Tabla 11 se muestran los efectos de los probióticos descritos sobre el sistema inmunitario (Erickson y Hubbard, 2000).

**Tabla 11.** Efectos de los probióticos sobre el sistema inmunitario en roedores y el hombre

| Probiótico/vía administración   | Especie | Efecto  |
|---|---------|---|
| <b>INMUNIDAD HUMORAL</b>  |         |   |
| <i>L. casei</i> Shirota, oral (muerta)  | Roedor  | Inhibición esplénica de IgE <i>in vitro</i> y IgE sérica                    |
| <i>L. casei</i> , oral (viva)   | Roedor  | Incremento de IgA y reducción de infección entérica                         |
| <i>L. acidophilus</i> +<br><i>Peptostreptococcus</i> , oral (viva)                    | Roedor  | Descenso de la translocación e incremento de anti- <i>E. coli</i> IgM y IgE |
| <i>B. bifidum</i> , oral (viva)   | Humano  | Incremento de IgA y células B   |
| <b>PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS</b>   |         |   |
| <i>L. casei</i> , oral (seco)   | Humano  | Incremento IFN $\gamma$ sérica  |
| <i>L. GG</i> , oral (viva)  | Humano  | Descenso fecal de TNF $\alpha$ en pacientes con alergia alimentaria         |
| <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ,<br><i>Streptococcus</i> , oral (viva) | Roedor  | Mejora de IL-6 y IL-12 y de IFN $\gamma$ y TNF $\alpha$                     |
| <b>INMUNIDAD NO ESPECÍFICA</b>  |         |   |
| <i>L. casei</i> Shirota, intravenosa  | Roedor  | Incremento de fagocitosis   |
| <i>L. acidophilus</i> o <i>B. bifidum</i> , oral (viva)                               | Roedor  | Mejora de fagocitosis   |
| <i>L. acidophilus</i> o <i>casei</i> , oral (viva)                                    | Roedor  | Mejora de fagocitosis   |
| <i>L. casei</i> Shirota, oral (viva)  | Humano  | Sin efecto en citólisis <i>in vitro</i> de células killer                   |

Otros efectos de los probióticos descritos en la bibliografía científica incluyen efectos frente a las siguientes patologías: enfermedad alcohólica del hígado (Nanji y col., 1994), colitis ulcerativa (Kruis y col., 1997), alergia a la proteína láctea (Pelto y col., 1996), vaginitis candidial (Hilton y col., 1995), artritis crónica juvenil (Malin y col., 1996), efectos antioxidativos (Ahotupa y col., 1996), inhibición del carcinoma superficial de la vejiga (Aso y Akazan, 1992) y reducción de los niveles séricos de COL (Salminen y col., 1993; Sanders, 1993b).

A pesar de décadas de trabajo y de los efectos demostrados, el apoyo de la comunidad científica al concepto de probiótico es escaso (Sanders, 1993a) debido principalmente a una serie de motivos que pueden resumirse en los siguientes cinco puntos:

- 1- Se han propuesto numerosas cepas y especies bacterianas candidatas a ser catalogadas como probióticos.
- 2- La confusión sobre los resultados obtenidos con cepas bacterianas que no están adecuadamente identificadas y descritas.
- 3- La calidad de almacenamiento de los cultivos probióticos es variable, dando lugar a pérdidas de la dosis ingerida y de su actividad en las pruebas clínicas.
- 4- Las cepas únicas de probióticos a menudo son propuestas por aportar una multitud de beneficios a través de muchos individuos en una población en estudio.
- 5- Los elevados costes de las pruebas clínicas que utilizan de una forma drástica experimentos de “una cepa frente a un placebo”, con la intención de probar la eficacia del probiótico en poblaciones con un número limitado de individuos.

## 6.6. Eficacia y seguridad de los probióticos

Muchos estudios en los que se evalúa el efecto de los probióticos frente a la diarrea, la intolerancia a la lactosa y al cáncer de colon muestran que es necesaria una dosis efectiva de  $10^9$ - $10^{10}$  microorganismos al día (Sanders y col., 1996). Esta cifra corresponde a una ingestión de un litro de leche acidófila al día formulada al nivel típico de  $2 \times 10^6$  ufc/ml (Sanders, 1998a). Sin embargo, independientemente de la dosis administrada para que el probiótico pueda ejercer el efecto que se le presupone en el organismo, éste debe de sobrevivir en el alimento que lo vehicula. La viabilidad de una cepa probiótica en un alimento está íntimamente relacionada con los tratamientos tecnológicos. Así, la supervivencia de la cepa depende del pH del alimento y de su capacidad tamponadora, de la presencia de microorganismos competitivos, de la temperatura y de la presencia de inhibidores microbianos en el alimento (cloruro sódico (NaCl) y  $H_2O_2$ ) (Kurmann y Rasic, 1991).

La vida comercial de un producto refrigerado que contenga probióticos es de tres a seis semanas, siendo más estable el contenido en productos no refrigerados. Para suplementos desecados el tiempo de vida comercial es de doce meses, aunque los niveles descienden significativamente durante este tiempo (Kopp-Hoolihan, 2001). Se han detectado casos de marcada pérdida de la viabilidad en productos lácteos tanto con bifidobacterias como con lactobacilos, más marcada durante su almacenamiento en refrigeración a pH bajo (Klaver y col., 1993; Lankaputhra y col., 1996). Por el contrario, las bifidobacterias sobreviven bien en productos de baja acidez como el yogurt congelado (Laroia y Martin, 1991), los helados (Hekmat y McMahon, 1992) o el queso (Dinakar y Mistry, 1994).

La selección de especies tolerantes al  $O_2$  podría ser una solución para minimizar el efecto adverso del  $O_2$  en productos fermentados que contengan *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. Los primeros estudios de sensibilidad al  $O_2$  permitieron establecer tres categorías de doce cepas de bifidobacterias según el alcance de la inhibición del crecimiento en presencia de  $O_2$ , aunque no se pudo establecer una correlación entre la sensibilidad al  $O_2$  y la

actividad enzimática relacionada con el metabolismo del O<sub>2</sub> (de Vries y Stouthamer, 1969). Por el contrario, Shimamura y col. (1992) establecieron una fuerte correlación inversa entre las actividades enzimáticas (NADH oxidasa y NADH peroxidasa) y el grado de sensibilidad al O<sub>2</sub> en cuatro especies de bifidobacterias. Así, encontraron que *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* fueron mucho más tolerantes al O<sub>2</sub> (mostraron una mayor actividad de las enzimas anteriormente mencionadas) que *B. adolescentis* (con muy baja actividad enzimática), por lo que las tres primeras especies podrían ser más apropiadas para las aplicación industrial de probióticos en los alimentos. Estos resultados permiten además apoyar la hipótesis enunciada por estos mismos autores (Shimamura y col., 1990) en la que se establece que la ruta que implica a las dos enzimas NADH oxidativas sirve como un mecanismo de defensa para reducir la toxicidad al O<sub>2</sub> en *Bifidobacterium* spp.

En cualquier caso, han sido establecidas una serie de cantidades mínimas en los productos que contienen microorganismos probióticos para asegurar su efectividad en el organismo que los ingiere, de tal forma que los productos fermentados deben contener al menos 10<sup>6</sup> ufc/mL, ya que normalmente se considera que la dosis terapéutica mínima diaria es 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> células viables, suponiendo una ingestión de 100 g de producto fermentado que contenga 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> ufc/mL (Rasic y Kurmann, 1983).

El sello "Live active culture" (cultivo activo vivo) establecido por la National Yogurt Association americana, requiere la presencia de al menos 10<sup>8</sup> BAL viables/g en el momento de la elaboración para yogures refrigerados, y 10<sup>7</sup>/g para yogures congelados. Los fabricantes de cultivos recomiendan incluir aproximadamente 10<sup>6</sup> bacterias probióticas/g para yogures y leche acidófila al final de la vida útil del producto (Kopp-Hoolihan, 2001).

En cuanto a la seguridad de las bacterias empleadas como probióticos, existe un acuerdo general por el que las BAL se consideran microorganismos benignos, y existen registros bien establecidos sobre su seguridad. A este hecho hay que añadir el que no se ha notificado ningún brote de contaminación alimentaria relacionado con estos microorganismos (Sgobarti y col., 1995). La FDA debido a la larga historia de su empleo en alimentos fermentados ha designado a muchos de estos probióticos como GRAS (Generally Recognized As Safe, generalmente reconocido como seguro), e incluso para aquellos probióticos que no gozan del estado GRAS, la industria los ha utilizado en alimentos fermentados asumiendo que la historia de su uso en la alimentación lleva implícito la seguridad de los mismos (Kopp-Hoolihan, 2001).

Dosis elevadas de probióticos del orden de 10<sup>12</sup> ufc/g no han mostrado ninguna toxicidad, sólo *B. dentium* se considera actualmente como patógena para el hombre por su papel en la caries dental (Sgobarti y col., 1995).

## **7. PREBIÓTICOS**

### **7.1. Definición y criterios que debe cumplir un prebiótico**

Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del hospedador (Gibson y Roberfroid, 1995). Para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico debe cumplir según Gibson (1999) los siguientes requisitos:

- 1- No ser hidrolizado ni absorbido en la parte anterior del tracto GI.
- 2- Ser un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias comensales beneficiosas del colon, estimulando su crecimiento y/o metabolismo.
- 3- Modificar la composición de la flora del colon, facilitando el desarrollo de especies beneficiosas.
- 4- Inducir efectos en lumen o sistémicos que son beneficiosos para la salud del hospedador.

Los hidratos de carbono no digeribles (OS y PS), algunos péptidos y proteínas, y ciertos lípidos (ésteres y éteres) son considerados como prebióticos. Debido a su estructura química, estos compuestos no son absorbidos en la parte anterior del tracto GI o no son hidrolizados por enzimas digestivas humanas. Estos compuestos se podrían llamar "alimentos del colon", puesto que entran en el colon y sirven como sustratos para las bacterias endógenas del mismo, así indirectamente proporcionan al hospedador energía, sustratos metabólicos y micronutrientes esenciales (Gibson y Roberfroid, 1995).

En términos prácticos, los prebióticos tienen algunas ventajas sobre los probióticos. Claramente, la supervivencia del producto no es algo cuestionable, ya que el alimento puede ser expuesto al calor (esto no es posible con microorganismos vivos) y el tipo de vehículo de la dieta es muy amplio. Además, los problemas que se pueden experimentar tras la ingestión de probióticos no deberían de aparecer con el empleo de prebióticos ya que el objetivo es el fortalecimiento de la propia flora autóctona (Gibson y McCartney, 1998).

A pesar de estas consideraciones, hay determinados casos en los que la ingestión de probióticos es asequible y deseable. Por ejemplo, en poblaciones de riesgo como los niños y los ancianos, donde la flora intestinal puede estar comprometida, podría ser más adecuado potenciar la microflora mediante el uso de probióticos (Gibson y McCartney, 1998).

### **7.2. Oligosacáridos (OS) y Oligosacáridos no digeribles (OND)**

Los hidratos de carbono no son simplemente fuente de energía, sino que debido a la estructura física de la pared celular de la que forman parte tienen efecto sobre la saciedad

(Blundell y col., 1994) y la proporción y extensión de la digestión del almidón, que es el principal factor de control sanguíneo de glucosa e insulina (Jenkins y col., 1981; Englyst y col., 1996). Los hidratos de carbono se pueden clasificar en base al grado de polimerización (GP) como OS (GP entre 2 y 10 unidades de monosacáridos) y PS (GP más de 10 monosacáridos) (Cummings y col., 1997). Al mismo tiempo, según sus propiedades fisiológicas se pueden clasificar como digeribles o no digeribles (o no disponibles). Los no digeribles que están representados por el almidón resistente, PS no almidón (PS de las paredes celulares de las plantas, hemicelulosa, pectinas, gomas), y OND (Delzenne y Roberfroid, 1994), muestran varios efectos fisiológicos y nutricionales. Sin embargo, no todos los compuestos que están clasificados como “alimentos del colon” son prebióticos. De hecho, para la mayoría de estas sustancias, el proceso de fermentación en el colon no está bien especificado, y pueden además estimular en el colon el crecimiento y/o la actividad metabólica de diferentes especies bacterianas, incluyendo especies que son tanto perjudiciales como beneficiosas (Drasar y col., 1976; Wang y Gibson, 1993).

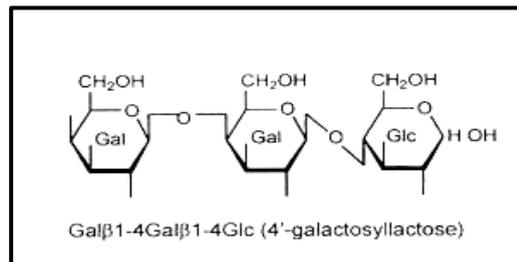
### 7.2.1. Propiedades de los OS

Los OS son hidratos de carbono con un GP bajo y consecuentemente bajo peso molecular (Yun, 1996). Según la terminología de la IUB-IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1982), el punto de división entre OS y PS en base al GP es 10, aunque no haya ninguna razón fisiológica o química que justifique esta división (Cummings y col., 1997). Recientemente Englyst y Hudson (1996) propusieron el nombre de “hidratos de carbono de cadena corta” para un nuevo grupo de hidratos de carbono alimenticios que incluyan a los OS y los PS más pequeños. Para propósitos analíticos, la solubilidad en etanol 80% (v/v) ha sido validada como una forma práctica de aislar a este grupo de hidratos de carbono (Englyst y Hudson, 1996; Cummings y col., 1997). Para una mejor comprensión, en la Tabla 12 se muestra la clasificación de los principales hidratos de carbono de la dieta (Cummings y Englyst, 1995; Englyst y Hudson, 1996).

**Tabla 12.** Clasificación de los principales hidratos de carbono de la dieta

| Clases (GP)              | Subgrupos (tipo de monosacárido y uniones a ó b)   |
|--------------------------|--|
| Azúcares<br>(1-2)        | Monosacáridos: fructosa, galactosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa<br>Disacáridos: celobiosa, gentibiosa, lactosa, maltosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa<br>Polialcoholes: sorbitol, maltitol, lactitol, xilitol |
| Oligosacáridos<br>(3-10) | Maltooligosacáridos ( $\alpha$ -glucanos)<br>Otros oligosacáridos ( $\beta$ -OND): fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, rafinosa, estaquiosa   |
| Polisacáridos<br>(>10)   | Almidón ( $\alpha$ -glucanos): amilopectina, amilosa<br>Polisacáridos no almidón: celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas, mucílagos, $\beta$ -glucanos  |

El concepto de OND se debe a de que el átomo de C anomérico ( $C_1$  ó  $C_2$ ) de las unidades de monosacáridos de algunos OS dietéticos (Figura 6), tiene una configuración que hace a sus enlaces osídicos no digeribles por la actividad hidrolítica de las enzimas digestives humanas. Esta resistencia a la digestión ha sido demostrada en varios ensayos, incluyendo voluntarios humanos ileostomizados. Las principales categorías de OS actualmente disponibles o en desarrollo como ingredientes alimenticios incluye a hidratos de carbono en los que la unidad de monosacárido es fructosa, galactosa, glucosa, y/o xilosa (Delzenne y Roberfroid, 1994; Cummings y col., 1996; Crittenden y Playne, 1996).



**Figura 6.** Estructura típica de un oligosacárido

En general, los alimentos clasificados como OS no son productos puros, sino que son mezclas de OS con diferentes grados de polimerización, el polisacárido o disacárido original y los azúcares monoméricos. Aunque las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de cada oligosacárido varían dependiendo del tipo de mezcla adquirida, algunas propiedades son comunes a casi todos los OS.

Junto a las propiedades de los OS enumeradas anteriormente hay que destacar que son solubles en agua y medianamente dulces, normalmente 0,3-0,6 veces tan dulce como la sacarosa, aunque esta propiedad decrece con la longitud de la cadena. Además, debido a la fermentación del colon, dan una contribución energética al alimento de 1,5 kcal/g, similar al de la FD soluble. Los OND proporcionan una elevada capacidad de retención de humedad, previniendo una excesiva desecación, y una baja actividad agua, que es conveniente en el control de la contaminación microbiana (Nakakuki, 1993).

### 7.2.2. Tipos de OS

Como anteriormente se ha descrito, los OND se encuentran en diferentes alimentos de forma natural, sin embargo también pueden ser producidos mediante diferentes reacciones químicas en el laboratorio. Principalmente existen 3 métodos para elaborar los OND como a continuación se resume:

1. Mediante la extracción directa en agua caliente de diferentes raíces, como la chicoria o alcachofa de Jerusalén para extraer la inulina, o de semillas para la obtención de los SOS.

2. Hidrólisis enzimática parcial de OND, como en la obtención de oligofruktosa a partir del hidrolizado de la inulina (De Bruyn y col., 1992), o de PS para obtener los XOS por la acción de xilanasas sobre los xilanopolisacáridos (Yamaguchi y col., 1994).
3. Síntesis enzimática de un disacárido o de una mezcla de disacáridos usando osiltransferasas, como la obtención de FOS de cadena corta (FOS cc) a partir de la sacarosa (Spiegel y col., 1994), los GOS a partir de la lactosa y la lactosucrosa a partir de una mezcla de sacarosa y lactosa (Yamaguchi y col., 1994).

El organismo humano carece de los enzimas digestivos necesarios para poder hidrolizar los OND, puesto que éstas,  $\alpha$ -glucosidasa, maltasa-isomaltasa y sucrasa, son en su mayor parte específicas de uniones  $\alpha$ -osídicas. Debido a que las enzimas no pueden romper el enlace glucosídico  $\beta$ , los OND a nivel nutritivo se comportan como fibras alimentarias solubles, ya que llegan íntegros al intestino grueso donde son fermentados por la flora del colon (Tsuji y col., 1986; Tokunaga y col., 1989; Molis y col., 1996). En la Figura 7 se representan esquemáticamente los diferentes procesos de producción de los OS, y en la Tabla 13 se muestran los OS encontrados en la bibliografía científica como candidatos a ejercer un efecto prebiótico.

**Tabla 13.** Nombre y estructura química de los oligosacáridos (OS)

| Nombre                               | Nombre comercial      | Estructura química y tipo de enlace osídico  |
|--------------------------------------|-----------------------|--|
| Inulina                              | Raftiline®            | $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-Fru] <sub>n</sub> -(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fru (n=10 $\rightarrow$ 60) |
| Oligofruktosa                        | Raftilose®            | $\beta$ -D-Fru (1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-Fru] <sub>n</sub> -(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fru (n=2 $\rightarrow$ 10)   |
| Fructooligosacáridos de cadena corta | Actilight®, Neosugar® | $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-Fru] <sub>n</sub> -(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fru (n=1 $\rightarrow$ 3)   |
| Galactooligosacáridos                | Oligomate®            | $\alpha$ -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-Gal] <sub>n</sub> -(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-Glu (n=1 $\rightarrow$ 5)   |
| Galactotriosa/TOS                    | Cup-Oligo®            | $\alpha$ -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-Gal] <sub>n</sub> (n=2)   |
| Isomaltooligosacáridos               | Isomalto-900®         | [ $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 6)] <sub>n</sub> (n=2 $\rightarrow$ 5)  |
| Sojaoligosacáridos                   | Soya-Oligo®           | [ $\alpha$ -D-Gal (1 $\rightarrow$ 6)] <sub>n</sub> - $\alpha$ -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 2) $\beta$ -D-Fru (n=1 $\rightarrow$ 3) |
| Xilooligosacáridos                   | -                     | [ $\beta$ -D-Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)] <sub>n</sub> (n=2 $\rightarrow$ 9)   |
| Gentiooligosacáridos                 | Gentose®              | [ $\beta$ -D-Glu-(1 $\rightarrow$ 6)] <sub>n</sub> (n=2 $\rightarrow$ 5)   |
| Lactulosa                            | Duphalac®             | $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Fru   |
| Lactosucrosa                         | -                     | $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Fru  |
| Celobiosa                            | -                     | $\beta$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 4)-D-Glu   |
| Celodextrinas                        | -                     | [ $\beta$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 4)] <sub>n</sub> -D-Glu (n=3-6)  |
| Ciclodextrinas                       | Dexy Pearl®           | [ $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 4)] <sub>n</sub> cíclico (n=6-12)   |
| Glucanooligosacáridos                | -                     | -  |
| Leucrosa                             | -                     | $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 5)-D-Fru  |
| Maltitol                             | -                     | $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 6)-D-Sor  |
| Palatinosaoligosacáridos             | -                     | [ $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 6)-D-Fru] <sub>n</sub> (n=2-4)  |
| Lactitol                             | -                     | $\beta$ -D-Gal (1 $\rightarrow$ 4)-D-Sor   |
| Maltooligosacáridos                  | -                     | [ $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 4)] <sub>n</sub> (n=2 $\rightarrow$ 7)  |
| Manooligosacáridos                   | Alltech®              | [ $\alpha$ -D-Man (1 $\rightarrow$ 6)] <sub>n</sub> (n=2 $\rightarrow$ 8)  |
| Glucosilucrosa                       | Coupling Sugar®       | $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glu (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Fru                                       |
| Glucooligosacáridos                  | -                     | [ $\alpha$ -D-Glu] <sub>n</sub> (n=2-6)  |

Fru=Fructosa, Gal=Galactosa, Glu=Glucosa, Man=Manosa, Sor=Sorbitol, Xyl=Xilosa  
Adaptado de Delzenne y Roberfroid (1994) y Crittenden y Playne (1996)

Sin embargo, no todos los compuestos listados en la Tabla 13 han demostrado científicamente su capacidad como prebiótico, debido en parte a su digestión total o parcial por las enzimas del ID humano, por la imposibilidad de promover una fermentación selectiva en el colon y por la falta de estudios concluyentes. Por tanto el número de OND reales se reduce a los siguientes: FOS, GOS y SOS, que por otra parte han sido los más extensamente estudiados y pueden proporcionar la mejor evidencia de los efectos prebióticos en humanos (Crittenden y Playne, 1996), y son los que a continuación se describen.

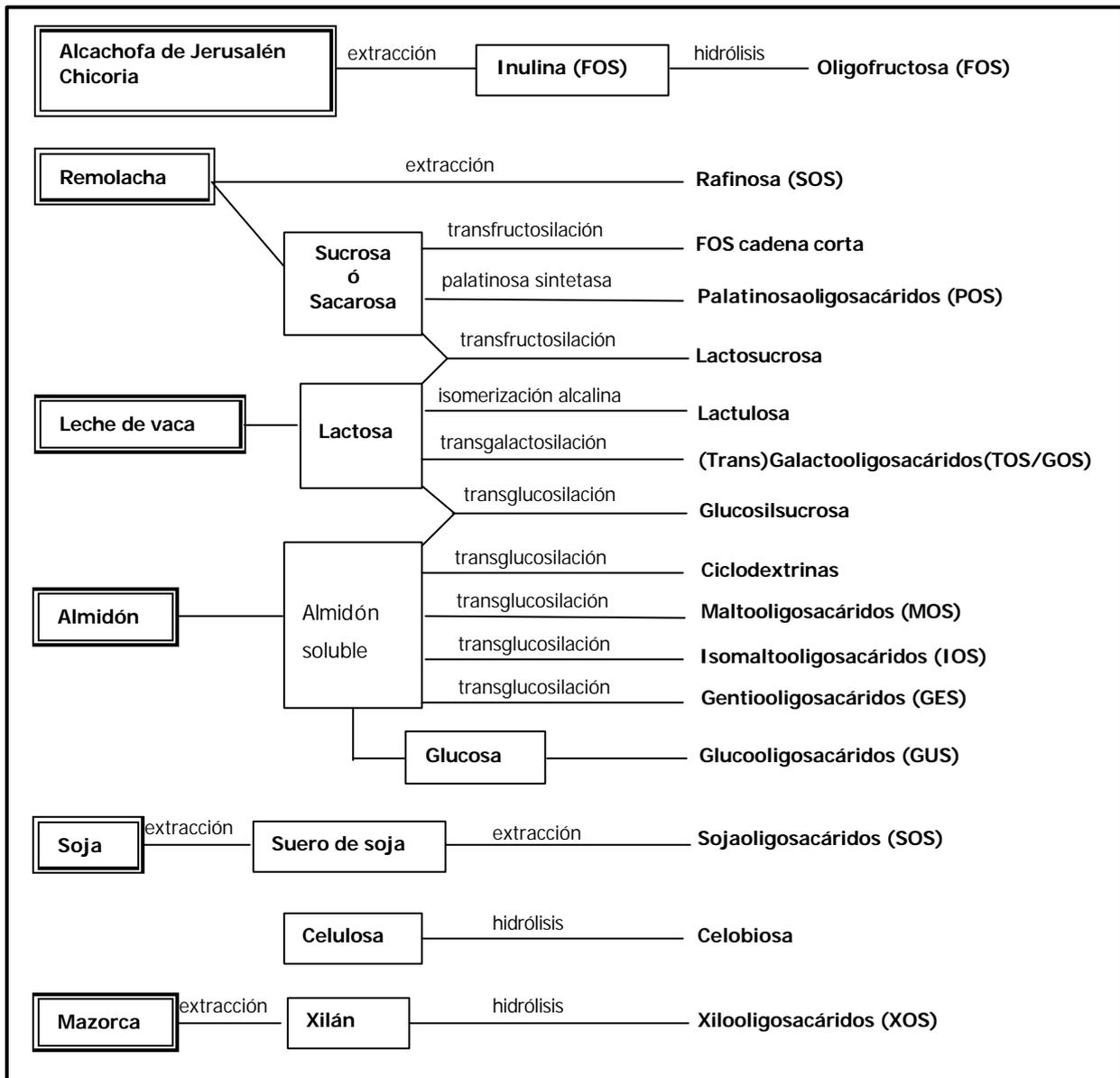


Figura 7. Esquema que representa los procesos de producción de los oligosacáridos (OS)

Galactooligosacáridos (GOS). El establecimiento de una microflora de bifidobacterias en el intestino de los niños alimentados a pecho se ha atribuido a la presencia de OND que contienen galactosa en la leche humana (Smart, 1993). Por tanto, la inclusión de GOS como ingredientes alimenticios prebióticos ha atraído un interés comercial considerable, y varias

empresas están actualmente implicadas en su producción. Son producidos comercialmente a partir de la lactosa usando la actividad galactosiltransferasa de la  $\beta$ -galactosidasa, que es la principal enzima en la hidrólisis de lactosa en elevadas concentraciones de ésta (Smart, 1993).

Fructooligosacáridos (FOS). Es uno de los principales OND bifidogénicos en cuanto a volumen de producción. Se elaboran mediante 2 procesos, que resultan en productos finales ligeramente diferentes. En el primer método, los FOS se producen a partir del disacárido sacarosa usando la actividad transfructosilación del enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa de *Aspergillus niger*. Al igual que sucede en la producción de GOS, se necesita una elevada concentración de material inicial para una eficaz transglucosilación (Park y Almeida, 1991). Los FOS así formados contienen entre 2 y 4 unidades de fructosa unidas con enlaces  $\beta(2\rightarrow1)$ , con un residuo terminal  $\alpha$ -D-glucosa, y entre ellos cabe destacar: 1-kestosa (Glu-Fru<sub>2</sub>), 1-nistosa (Glu-Fru<sub>3</sub>) y 1<sup>F</sup>-fructosilnistosa (Glu-Fru<sub>4</sub>). Dependiendo del productor a esta mezcla de FOS cc se les ha denominado como "Actilight", "Nutraflora" ó "Meliogo". El segundo método es la hidrólisis enzimática o química de la inulina. La mezcla de FOS formada por este proceso se parece a la mezcla producida por el proceso de transfructosilación. Sin embargo, no todas las cadenas fructosa con uniones  $\beta(2\rightarrow1)$  acaban en una glucosa terminal (Fru<sub>m</sub>, m=1-7). A este producto se le conoce como oligofructosa.

Sojaoligosacáridos (SOS). Son extraídos directamente del alimento crudo y no requieren procesos enzimáticos de elaboración. El suero de la soja, un producto de la producción de concentrados y aislados de proteínas de soja, contiene OS rafinosa (formado por fructosa, galactosa y glucosa) y estaquiosa, ésta última tiene un residuo de galactosa más. Ambos son indigeribles y por tanto alcanzan el colon intactos, donde actúan como prebióticos, estimulando el crecimiento de las bifidobacterias en el hombre (Benno y col., 1987).

### 7.3. Efecto fisiológico de los OND a nivel sistémico

Los OND más ampliamente estudiados son los FOS y los GOS. En este apartado se van a señalar los efectos a nivel GI que han sido descritos únicamente para los FOS, y debido a la importancia que tienen los GOS en este trabajo, éstos se van a tratar en el apartado 7.4 de esta sección. Estos efectos se pueden clasificar en los cinco que continuación se describen:

Producción de ácidos grasos de cadena corta y efectos asociados. La fermentación en el colon de OND produce AGCC, lactato, y determinados gases. Todos los hidratos de carbono que son fermentados en el colon humano deberían dar un valor calórico de 1,5 kcal/g (6,3 KJ/g) (Cummings y Frohlich, 1993). Para la inulina y oligofructosa los valores publicados de producción de AGCC varían entre 1 y 2,1 kcal/g (4,2 a 8,8 KJ/g) (Livesey, 1992; Roberfroid y col., 1993; Molis y col., 1996).

De estudios *in vivo* en animales se puede concluir que el enriquecimiento con OND desciende el pH cecal e incrementa la producción de AGCC cecales, siendo el acetato el

principal seguido por el butirato y propionato (Ito y col., 1993; Rowland y Tanaka, 1993; Campbell y col., 1997). Este incremento en la producción de AGCC está relacionado con una hiperplasia de la mucosa intestinal e incremento del grosor de la pared tanto en el ID como en el ciego (Hoshi y col., 1994; Campbell y col., 1997).

Efecto sobre el metabolismo de los lípidos. La mayoría de los estudios que muestran efectos de los OND sobre los lípidos sanguíneos, tanto en animales como en humanos han sido realizados con FOS. A continuación se describen los efectos de los OND sobre el metabolismo de los lípidos descritos en la bibliografía científica.

1. Estudios en animales. La administración de inulina y oligofruktosa en ratas han demostrado descender los niveles de TG séricos, COL total y fosfolípidos, pero no los niveles de AG libres (Bhattathiry, 1968; Hata y col. 1983; Tokunaga y col., 1986; Fiordaliso y col., 1995). En un estudio más reciente, Kok y col (1998b) demostraron que el incremento postprandial de TG inducido por una dieta rica en grasas fue disminuido en ratas (-50%) por la administración de oligofruktosa. Estos autores explicaron que la hipotrigliceridemia observada se debió principalmente al descenso en la concentración en plasma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Sin embargo, Kok y col. (1996a) describieron que este efecto probablemente era debido más bien a un descenso de la síntesis hepática de TG que a un incremento en el catabolismo de lipoproteínas ricas en TG. Estos datos apoyan la hipótesis de que un descenso en la lipogénesis *de novo* en el hígado, a través de una reducción coordinada de la actividad de todas las enzimas lipolíticas, es un acontecimiento clave en la reducción de la secreción de VLDL-TG en ratas alimentadas con inulina. El hecho de que la lipogénesis *de novo* sea la base para desarrollar el efecto hipotrigliceridémico de los FOS en el hígado de la rata, podría explicar el escaso efecto observado en humanos sanos, que consumen muchos menos hidratos de carbono que los roedores (Roberfroid y Slavin, 2000).

2. Estudios en humanos. Ha sido descrito un descenso de los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y COL total en individuos con diabetes no insulino-dependiente mediante el empleo de oligofruktosa (Yamashita y col., 1984; Luo y col., 1996), y de TG y COL total con inulina (Canzi y col., 1995), mientras que el empleo de inulina en voluntarios hiperlipidémicos ha mostrado un descenso de los TG (Williams, 1999) y del COL y LDL (Davidson y col., 1998). Sin embargo, cuando los estudios se llevaron a cabo en individuos sanos y normolipidémicos no se observó ningún efecto sobre los niveles lipídicos tras la administración de inulina, oligofruktosa o transgalactooligosacáridos (TOS) (Van Dokkum y col., 1995; Pedersen y col., 1997; Ellegård y col. 1997).

El papel de los AGCC en estos efectos es difícil de establecer, ya que ni aislados ni en una mezcla estos ácidos tienen efectos antagonistas sobre el metabolismo del COL. Se ha confirmado que el acetato siendo un precursor metabólico del COL, está presente al comienzo de la hipercolesterolemia observada en pacientes sanos que recibieron lactulosa (Jenkins y col., 1991), mientras que el propionato, que disminuye los niveles de COL sérico cuando se

administra en la dieta de ratas, puede descender la síntesis de COL mediante la inhibición de la 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa (Rodwell y col., 1976).

Por tanto y aunque en los estudios con ratas sí parece existir un claro efecto favorable de los OND sobre el metabolismo lipídico, en los humanos los datos recogidos de la bibliografía son todavía inconsistentes para hablar de un efecto claro.

Efecto sobre la uremia y eliminación de nitrógeno/urea. Los FOS cc incrementan eficazmente la excreción fecal de N y reducen la excreción renal de N en ratas (Younes y col., 1996). Este efecto ocurre porque estos hidratos de carbono fermentables sirven como fuente de energía para las bacterias intestinales, que durante el crecimiento también requieren de una fuente de N para la síntesis proteica. Además, su efecto osmótico en el ID acelera el tránsito de urea al íleon distal y al intestino grueso donde puede proliferar una amplia microflora ureolítica. De hecho, la cantidad de NH<sub>3</sub> requerido para sustentar el crecimiento del máximo de bacterias podría llegar a ser insuficiente, y la urea en sangre sería entonces requerida como una fuente fácil para la síntesis proteica bacteriana en el ciego (Younes y col., 1997).

Debido al efecto osmótico, que puede transferir agua al intestino grueso (un efecto que está inversamente relacionado con la longitud de cadena), y por su elevada tasa de fermentación y producción de gases, altas dosis de FOS podrían causar malestar intestinal o incluso diarrea. Este efecto no es específico para los OND pero es común a todas las sustancias dietéticas no digeribles y fermentables. La estimación de una *dosis aceptable* es difícil porque cada individuo tiene su propia sensibilidad sobre la molestia intestinal *aceptable* y *no aceptable*. Las conclusiones que se pueden alcanzar con los datos disponibles en cuanto a la relación entre la ingesta de FOS y síntomas gastrointestinales (Stone-Dorshow y Levitt, 1986; Pellier y col., 1995) son las siguientes:

- En forma líquida, una dosis única de 10 g no causa efecto, mientras que 20 g causan síntomas transitorios medios. Excepto para determinados individuos, aquellos que estén probablemente adaptados a una dieta alta en fruta-vegetales-cereales, la dosis única que probablemente cause una gran molestia o incluso diarrea en la mayoría de las personas es del orden de 30 g (Roberfroid y Slavin, 2000).
- Si los FOS son tomados como una parte de un alimento sólido, la dosis sensible es relativamente superior a la forma líquida. Si la dosis se divide durante todo el día en pequeños servicios individuales, los síntomas se reducen y, en la mayoría de los casos desaparecerán incluso para dosis tan altas como 20-30 g (Roberfroid y Slavin, 2000).

## 7.4. Galactooligosacáridos (GOS)

### 7.4.1. Producción y propiedades de los GOS

Los GOS se producen por la acción de las  $\beta$ -galactosidasas con actividad de transgalactosilación. Las uniones glicosídicas entre dos unidades de galactosa principalmente son uniones del tipo  $\beta(1-4)$  (como 4'-galactosil-lactosa, 4'-GOS) cuando se usan las  $\beta$ -galactosidasas derivadas de *Bacillus circulans* (Mozaffar y col., 1984) o de *Cryptococcus laurentii* (Ozawa y col., 1989), y del tipo  $\beta(1-6)$  (como 6'-galactosil-lactosa, 6'-GOS) cuando se usan las enzimas derivadas de *A. oryzae* o *Streptococcus thermophilus* (Matsumoto, 1990). Normalmente más del 55% de la lactosa que se emplea como sustrato se convierte en GOS (Ishikawa y col., 1995). Aunque los principales productos de la reacción son desde tri- hasta hexasacáridos con dos a cinco unidades de galactosa, también se producen en la reacción disacáridos transgalactosilados (DT) formados por una molécula de galactosa y otra de glucosa con un enlace  $\beta$ -glicosídico diferente al de la lactosa. En cualquier caso y para resumir el proceso, los principales productos son trisacáridos, particularmente 4'-GOS ó 6'-GOS, y OS mayores con cuatro o más unidades de monosacárido.

Las propiedades fisicoquímicas que mejor se conocen son las de un producto del mercado japonés (Oligomate 55) que contiene al menos un 55% de 4'-GOS incluyendo también DT. El relativo dulzor de este producto es alrededor del 35% del de la sacarosa. Los GOS son estables a altas temperaturas, ya que permanecen sin alteración tras un tratamiento de 160 °C durante 10 min a pH neutro. Sin embargo, a 120 °C durante 10 min a pH 3 ó 100 °C durante 10 min a pH 2 alrededor de la mitad o más de la sacarosa es degradada. También son bastante estables durante un almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente incluso en condiciones de acidez. La estabilidad por lo tanto de los GOS es mayor que la de los FOS (Voragen, 1998).

### 7.4.2. Efectos de los GOS sobre la salud humana

Los GOS han sido estudiados ampliamente por su papel fisiológico sobre la flora intestinal, derivado principalmente de sus características fisicoquímicas. Los principales efectos descritos por los GOS sobre la salud humana se detallan a continuación.

Indigestibilidad en el tracto gastrointestinal superior y valor energético. Ha sido demostrado en varios experimentos *in vitro* la indigestibilidad y la estabilidad de los GOS a la hidrólisis por la  $\alpha$ -amilasa de la saliva humana y pancreas de cerdo, el contenido del ID de rata y el jugo gástrico humano artificial (Ohtsuka y col., 1990). Como otros OND, tienen configuración  $\beta$ , mientras que las enzimas digestivas gastrointestinales humanas son principalmente específicas para uniones  $\alpha$ -glicosídicas. Además, la actividad lactasa ( $\beta$ -

galactosidasa) localizada en el ribete en cepillo de la mucosa del ID, que tiene el potencial para digerir GOS, es normalmente débil o a menudo deficiente (Ito y Kimura, 1993).

La indigestibilidad *in vivo* de los GOS ha sido demostrada mediante el test de respiración de H<sub>2</sub> en estudios humanos (Tanaka y col., 1983; Ishikawa y col., 1995). El tiempo de tránsito buco-cecal de 4'-GOS se ha estimado en 1,9 h (Ishikawa y col., 1995), indicando que los GOS resisten la digestión y la absorción del ID y alcanzan íntegros el ciego y el colon, donde son fermentados por las bacterias del colon.

El valor calórico de los OND tales como GOS, FOS y lactulosa ha sido estimado en 1,0-2,0 kcal/g (Roberfroid y col., 1993; Cummings y col., 1997). Para los GOS el valor calórico está calculado en 1,73 kcal/g de acuerdo con el método estandarizado en Japón (Sako y col., 1999).

Utilización *in vitro* de los GOS por las bacterias intestinales. Este efecto ha sido ampliamente estudiado (Tanaka y col., 1983; Ohtsuka y col., 1989; Ishikawa y col., 1995) ya que el compuesto 4'-GOS es selectivamente utilizado por todas las cepas de *Bifidobacterium* evaluadas en comparación con la lactulosa y rafinosa, cuya especificidad es menor. Otros estudios demuestran que algunas cepas de *Lactobacillus*, *Bacteroides* y *Clostridium* fermentan los GOS, y que los DT podrían incluso ser mejores substratos para estas bacterias (Tanaka y col., 1983; Ishikawa y col., 1995).

Muchas cepas de especies de *Bifidobacterium* producen enzimas glucolíticas ( $\beta$ -galactosidasas) que hidrolizan una amplia variedad de unidades de monosacáridos y diferentes uniones de glucósidos, mientras que las actividades enzimáticas de las otras bacterias son menos variadas y más débiles (Tochikura y col., 1986). No se conoce por el momento si estas múltiples enzimas glucolíticas están específicamente asociadas con *Bifidobacterium* o si otras bacterias del colon también las poseen. Sin embargo, es posible que aquellas bacterias que habitan el intestino grueso hayan adquirido diferentes actividades glucolíticas para utilizar eficientemente hidratos de carbono no digeribles que son abundantes en el colon.

Actividad bifidogénica. El hecho de que los niños alimentados a pecho tengan una flora intestinal con un número significativamente superior de bifidobacterias que los niños alimentados con fórmula, ha dirigido a muchos investigadores a estudiar y aislar los factores bifidogénicos que exclusivamente promueven el crecimiento de bifidobacterias en el intestino. Se han propuesto muchos candidatos derivados de la leche humana y otras fuentes. Los 6'-GOS son un componente de los OS de la leche humana (Yamashita y Kobata, 1974), su administración a adultos sanos a dosis de 10 g/día es suficiente para detectar un efecto bifidogénico (Tanaka y col., 1983; Ito y col., 1990; Bouhnik y col., 1997). Sin embargo, cuando el número inicial de bifidobacterias autóctonas es bajo, la ingestión diaria de 2,5 g/día de 6'-GOS es suficiente para producir un incremento en las bifidobacterias fecales (Ito y col., 1993). El incremento en bifidobacterias a veces está acompañado de un descenso de *Bacteroidaceae* (Tanaka y col., 1983), dando lugar a un cambio en el género dominante de la flora fecal de *Bacteroidaceae* a *Bifidobacterium*. En el caso de otros OND, la dosis necesaria para producir

este efecto es de 3 g/día para lactulosa (Terada y col., 1992) y de 1 g/día para los FOS (Tokunaga y col., 1990).

Metabolismo en el colon. Los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono por las bacterias del colon son AGCC, tales como ác. acético, propiónico y butírico, y los gases  $H_2$  y  $CO_2$ . Se piensa que los AGCC eficientemente absorbidos y utilizados por las células epiteliales del colon humano estimulan la absorción de sales y agua, el crecimiento de las células epiteliales y la motilidad intestinal (Cummings, 1981).

Aunque Ito y col. (1993) e Ishikawa y col. (1995) detectaron cambios en la microflora fecal de voluntarios sanos tras la ingestión de GOS, los cambios en la producción de AGCC en esos sujetos no fue evidente, ya que más del 95% de los AGCC producidos en el colon se absorben en esta región del intestino grueso como fuente de energía (Darcy-Vrillon y col., 1996), y algunas bacterias tienen la habilidad de utilizarlos.

En contraste, datos obtenidos de estudios con animales (Chonan y col., 1995; Kikuchi y col. 1996; Kikuchi-Hayakawa y col., 1997) claramente demostraron un descenso en el pH y un incremento en los AGCC y otros ácidos orgánicos en los contenidos cecales. El agrandamiento del ciego e incremento en el contenido cecal es común en estos animales tras el consumo de GOS. Además, los ácidos orgánicos que se incrementaron drásticamente en modelos con ratas fueron el ác. láctico y succínico (Chonan y col., 1996a; Chonan y Watanuki, 1996). Hay algunas evidencias de que estos ácidos también se incrementan en los contenidos cecales de ratas a las que se les adicionó flora humana y conocidas como ratas con flora humana asociada (Kikuchi y col., 1996) y en los contenidos fecales de voluntarios humanos (Ishikawa y col., 1995) tras el consumo de GOS. Parece lógico que estos ácidos orgánicos pueden ser las sustancias clave que disminuyen el pH del contenido del colon (Fukushima, 1998). El agrandamiento del ciego y el incremento en ác. succínico en el contenido cecal también fueron observados en ratas alimentadas con galactosilucrosa y xilosilfructosa (Hoshi y col., 1994).

Mejora de la defecación. En distintos estudios se ha demostrado que la administración de GOS tiene efectos beneficiosos sobre individuos afectados de estreñimiento (Narimiya y col., 1996; Deguchi, y col., 1997). En el estudio de Deguchi y col. (1997), 75 mujeres mejoraron la frecuencia de la defecación cuando ingirieron diariamente durante una semana 5 g de GOS (no se observó efecto con 2,5 g de GOS). En otro estudio con 50 sujetos, la ingestión de 10 g de GOS de nuevo mejoró significativamente la proporción de defecación (Deguchi y col., 1997). El motivo que justifica este hecho puede estar basado en la producción de AGCC, contribuyendo al incremento de la presión osmótica y a la estimulación del peristaltismo (Ishikawa y col., 1995).

Eliminación del amoniaco. Los mecanismos que están bajo este efecto probablemente se deban al incremento de las bifidobacterias y al descenso de ciertas bacterias autóctonas tales como *Bacteroides* que tienen potencial para producir  $NH_3$ . Deguchi y col. (1997) demostraron que algunas bifidobacterias tienen la habilidad de asimilar  $NH_3$  como fuente de N. Por tanto, la reducción del  $NH_3$  en sangre es atribuida al consumo de  $NH_3$  intestinal por las bifidobacterias incrementadas en número, además de la supresión de las bacterias productoras

de  $\text{NH}_3$ . En un estudio con personas sanas, la ingestión de 3 g/día de 4'-GOS redujo significativamente la concentración fecal de  $\text{NH}_3$  (Tamai y col., 1992). Ciertos aa derivados de compuestos putrefactivos producidos por las bacterias intestinales tales como fenol, *p*-cresol e indol, pueden también descender, lo que indica que hay un cambio drástico en el metabolismo bacteriano bajo la ingestión de 4'-GOS. Un resultado similar se observó en ratas con flora humana asociada (Kikuchi y col., 1996).

Prevención del cáncer de colon. Se ha sugerido que varias enzimas bacterianas, tales como  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa y nitroreductasa, podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis del colon convirtiendo pre-carcinógenos en carcinógenos (Rowland, 1988). En un estudio (Rowland y Tanaka, 1993) con ratas con flora humana asociada, la administración de 5% GOS ó de GOS más *B. breve* durante 4 semanas, produjo un incremento en la concentración cecal de anaerobios totales, lactobacilos y bifidobacterias así como un descenso en el número de enterobacterias. También se redujo significativamente el pH cecal tras la ingestión de GOS, así como la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa y nitroreductasa. Además, los autores describieron en este mismo estudio que la ingestión de GOS se asocia con un descenso en la conversión del carcinógeno dietético 2-amino-3-metil-3H-imidazol [4, 5-f] quinonina a su derivado 7-hidroxi con potencial genotóxico. En otro estudio, se describió que las personas que consumieron los DT también redujeron el pH fecal así como las concentraciones de  $\text{NH}_3$ , *p*-cresol e indol junto con un incremento de bifidobacterias y lactobacilos, y un descenso de *Bacteroides* (Ito y col., 1993).

Efectos sobre el colesterol y metabolismo lipídico. Son realmente escasos los estudios realizados en personas del efecto de los GOS sobre el metabolismo lipídico, por lo que aún no se pueden extraer conclusiones definitivas a este nivel. Así, mientras que en un estudio con 4'-GOS se observaron efectos positivos de sobre el metabolismo del COL en humanos (Hayashi, 1989), en otro estudio más reciente donde se administraron 15 g/día de inulina, oligofruktosa o TOS a 12 voluntarios, no se observó ningún efecto (van Dokkum y col. 1995).

Aplicaciones como ingredientes alimenticios. Hay que destacar la estabilidad de los GOS en condiciones de acidez y elevada temperatura, lo que facilita que éstos sean aplicados sin que se descompongan posteriormente en una amplia variedad de alimentos.

Actualmente los GOS se emplean como edulcorantes y adicionados a alimentos como leches fermentadas, panes, mermeladas, confitería, bebidas, etc. Durante la fermentación con levadura y en el horneado del pan los GOS no son destruidos, proporcionando un sabor y una textura excelentes a los productos de panadería. Los productos lácteos fermentados a los que se les han adicionado probióticos y GOS son otro buen ejemplo de la utilización de estos compuestos en un mercado creciente en Japón y Europa. Los alimentos infantiles y alimentos específicos para personas mayores y gente hospitalizada son prometedores campos de aplicación de los GOS, ya que estas personas son más susceptibles de sufrir cambios en su flora intestinal (Sako y col., 1999).

## 7.5. Efecto de los OND en la absorción mineral

Como ya se describió anteriormente, las necesidades minerales durante la lactancia son especialmente importantes ya que se requiere un adecuado aporte para un correcto desarrollo físico y mental. En este sentido es de vital importancia el Ca, Mg y P para la mineralización ósea (Moya y col., 1990), así como un correcto aporte de Fe puesto que la deficiencia en este mineral no es infrecuente en la infancia (Craig, 1994), y el desarrollo de una anemia ferropénica a esta edad puede dar lugar a problemas psicomotrices (Walter y col., 1989).

La composición de la dieta es un importante determinante en la densidad mineral del hueso durante el periodo de crecimiento, así como en la pérdida mineral ósea, particularmente entre las mujeres postmenopáusicas (Michaelsen y col., 1994). El mineral del hueso se deposita durante la niñez con un incremento más rápido durante la pubertad, no obstante esta deposición continúa a menor velocidad una vez que el crecimiento en altura se ha detenido (British Nutrition Foundation, 1989). El desarrollo máximo de masa ósea durante el crecimiento y la reducción de la pérdida de hueso posterior son las dos principales estrategias para prevenir la osteoporosis y el riesgo de fracturas que suceden en la 3ª edad (Weaver, 2000). Una ingesta suficiente de Ca y vitamina D podrían reducir el riesgo de fracturas (Michaelsen y col., 1994), sin embargo, el consumo de Ca dietético está por debajo de los niveles recomendados en muchos estados de la UE (European Commission, 1998).

Junto al contenido en Ca de la dieta, la absorción del Ca dietético de los alimentos es también un factor crítico para determinar la disponibilidad de este mineral en el desarrollo y mantenimiento óseo. En este sentido, en los últimos años hay un interés por identificar componentes alimentarios y/o ingredientes alimentarios funcionales que puedan influir positivamente sobre la absorción de Ca, con el fin de mejorar su biodisponibilidad en los alimentos (Kennefick y Cashman, 2000). Así, la leche y los productos lácteos son una importante fuente de minerales esenciales, aunque la disponibilidad del Ca en los productos lácteos está afectada por la naturaleza del complejo de Ca (Wong y LaCroix, 1982) y también por otros factores como su solubilidad e ionización (Allen, 1982). Sin embargo se ha demostrado que otros componentes de la leche además de la lactosa (Andrieux y Sacquet, 1983; Abrams y col., 2002), actúan como estimulantes de la absorción de Ca tales como la lactulosa (Brommage y col., 1993) y los fosfopéptidos derivados de la hidrólisis enzimática de la caseína (Naito y Suzuki, 1974).

Hay una evidencia emergente que muestra que ciertos OND pueden mejorar la absorción de Ca y quizás otros minerales en adolescentes y adultos (Cashman, 2002). La FD, pectina o celulosa, se caracteriza por pasar a través del ID sin ser digerida al igual que los OND, y de ahí que éstos hayan sido propuestos también como componentes de la FD. Sin embargo, la fibra muestra varias diferencias en sus propiedades físicas como dispersabilidad, viscosidad y capacidad de adsorción con respecto a OND como inulina y oligofruktosa (Schneeman, 1999). Estas diferencias presumiblemente explican la variación en los efectos fisiológicos y porqué los

OND, la fibra y los polialcoholes afectan al metabolismo mineral de forma tan diferente. A continuación se resumen los estudios realizados con hidratos de carbono no digeribles tanto en animales como humanos sobre su efecto en la absorción mineral.

### 7.5.1. Estudios en animales

El balance mineral es el método más comúnmente usado para evaluar el efecto que tiene el aporte de una determinada cantidad de OND a la dieta sobre la absorción mineral en las ratas. La mayoría de los experimentos duran de 3 a 4 semanas y se realizan con ratas en crecimiento. Las dosis usadas de OND varían entre 2,5 y 10% en la dieta. A continuación se describen los efectos encontrados en la bibliografía científica por mineral estudiado.

Calcio. La estimulación de la absorción de Ca por hidratos de carbono no digeribles en la dieta ha sido ampliamente descrito en ratas jóvenes y en crecimiento mediante la administración de FOS (Ohta y col., 1995a, 1998d, 1999; Delzenne y col., 1995), de TOS (Chonan y Watanuki, 1995), de lactulosa (Brommage y col., 1993), de almidón resistente (Schulz y col., 1993; Younes y col., 1996; Lopez y col., 1998), de 4'-GOS (Chonan y col., 2001), de 6'-GOS (Chonan y Watanuki, 1996) y de hidrolizado de goma guar (Hara y col., 1996, 1999). También se ha descrito en ratas ovariectomizadas alimentadas con GOS (Chonan y col., 1995), deficientes en Mg con FOS cc (Ohta y col., 1994a), deficientes en Fe con FOS cc (Ohta y col., 1995b), gastrectomizadas con FOS cc (Ohta y col., 1998b, 1998c), canuladas por el ciego (Chonan y Takahashi, 1999) y anémicas tras gastrectomía con FOS cc (Ohta y col., 1998a). En cuanto a la intensidad de la estimulación, Delzenne y col. (1995) observaron que la oligofruktosa estimuló la absorción de Ca de forma ligeramente más eficaz que la inulina, mientras que en otro estudio los FOS cc estimularon la absorción de Ca significativamente más que los GOS, pero igual que la rafinosa en ratas destetadas (Ohta y col., 1993).

Magnesio. La alimentación con FOS en ratas jóvenes mejora significativamente la retención de Mg cuando se añaden a una dieta normal (Delzenne y col., 1995; Ohta y col., 1993, 1995a, 1998d; Ohta, 1999), a una dieta deficiente en Mg (Ohta y col., 1994a) o proporcionados a animales anémicos y deficientes en Fe (Ohta y col., 1995b). Además, los FOS cc (Baba y col., 1996) y el 4'-GOS (Chonan y Takahashi, 1999) incrementan la absorción y retención de Mg en ratas canuladas por el ciego. Los FOS cc estimulan la absorción de Mg significativamente más que los GOS pero igual que la rafinosa en ratas destetadas (Ohta y col., 1993), mientras que en ratas cecectomizadas la administración de FOS cc incrementa la absorción de Mg (Ohta y col., 1994b). También ha sido observado un incremento en la absorción de Mg en ratas alimentadas con una dieta con 4'-GOS (Ishikawa y col., 1995; Chonan y col., 1996a, 2001). Otros hidratos de carbono no digeribles también han estimulado la absorción de Mg en ratas, tales como la lactulosa (Heijnen y col., 1993), la lactosa (Andrieux y Sacquet, 1983) o el almidón resistente (Schulz y col., 1993; Younes y col., 1996; Lopez y col., 1998).

Fósforo. Los estudios que muestran un efecto estimulante de los OND sobre la absorción de P son más escasos. Además Ohta (1999) necesitó una concentración de FOS cc del 15% para obtener un incremento significativo en la absorción de P, ya que estudios previos no observaron ningún efecto con dosis del 5% en ratas jóvenes deficientes en Mg (Ohta y col., 1994a), ni con 7,5% de FOS cc en ratas gastrectomizadas (Ohta y col., 1998b). En un estudio con ratas adultas ovariectomizadas, se observó que la absorción y retención de P no se vieron afectadas por la oligofructosa con un 0,5 ni un 1% de Ca en dieta, únicamente se redujo la excreción urinaria de P cuando la concentración de oligofructosa fue igual o superior al 5% (Scholz-Ahrens y Schrezenmeir, 2002).

Hierro. En ratas normales se ha descrito que el almidón resistente al 10% estimuló la absorción de Fe (Lopez y col., 1998), también con un 10% de oligofructosa aunque en menor medida que la absorción del Ca y Mg, pero de forma más efectiva que la del Zn (Delzenne y col., 1995). También se ha descrito en ratas la prevención de anemia tras una gastrectomía y dieta libre de Fe mediante la administración de FOS cc, así como un incremento significativo en la absorción aparente (AA) de Fe, en el hematocrito (Ht), en la concentración de Hb y en la eficiencia de regeneración de Hb (Ohta y col., 1995b, 1998a; Sakai y col., 2000). Ohta y col. (1999) describieron igualmente que la administración de FOS cc a ratas gastrectomizadas previno la anemia por incremento de la absorción tanto del Fe no-hemo (citrato Fe) como de Fe hemo.

#### Mecanismos por los que se incrementa la absorción mineral

Calcio. El intestino grueso puede representar el mayor lugar de absorción de Ca cuando tiene lugar la fermentación ácida (Younes y col., 1996), en este sentido se ha demostrado que los OND facilitan la absorción de Ca tanto a nivel colorectal (Ohta y col., 1995a) como cecal (Demigné y col., 1989; Révész y col., 1993; Ohta y col., 1994b). Así, hay estudios que indican que el efecto estimulante de los FOS cc (Ohta y col., 1994b) y GOS (Chonan y Takahashi, 1999) sobre la absorción del Ca sucede principalmente en el ciego, puesto que su absorción no aumentó en ratas cecectomizadas. También se observa un incremento de la absorción de Ca cuando las ratas reciben GOS por infusión en el estómago y en el ciego, con un efecto similar al encontrado cuando se les administra oralmente, indicando que los efectos estimulantes de los GOS se ejercen en el intestino grueso, incluido el ciego (Chonan y Takahashi, 1999). Sin embargo, en el intestino grueso el Ca está presente en una forma muy poco absorbible (Ammann y col., 1986), y para ser absorbido debe de encontrarse soluble e ionizado (Allen, 1982). Una manera de incrementar la absorción de Ca es mediante la ingestión de diferentes hidratos de carbono no digeribles, tales como la inulina (Levrat y col., 1991; Révész y col., 1993), FOS cc (Ohta y col., 1993), lactulosa (Demigné y col., 1989; Heijnen y col., 1993), lactosa (Brommage y col., 1993; Abrams y col., 2002), almidón resistente (Younes y col., 1996), TOS (Chonan y Watanuki, 1995), 6'-GOS (Chonan y Watanuki, 1996) y GOS (Chonan y

col., 1995). La fermentación de estos azúcares en el intestino grueso da lugar a la producción de AG volátiles en el ciego con la consiguiente disminución del pH del lumen (Campbell y col., 1997). Los productos de la fermentación de la inulina y oligofructosa son ác. láctico y AGCC, principalmente propionato y acetato, y en menor cantidad butirato (Levrat y col., 1991), con un efecto demostrado en el aumento de la concentración de Ca soluble e ionizado, acelerando de esta forma la difusión pasiva (Andrieux y Sacquet, 1986; Levrat y col., 1991; Younes y col., 1993; Rémesy y col., 1993; Schulz y col., 1993; Brommage y col., 1993; Heijnen y col., 1993; Ohta y col., 1996, 1993; Chonan y col., 1995; Lopez y col., 1998). También se ha observado una estimulación selectiva del crecimiento bacteriano en el lumen intestinal, sobretodo bifidobacterias y lactobacilos por parte de XOS y oligofructosa (Campbell y col., 1997), TGOS (Rowland y Tanaka, 1993), y FOS cc (Howard y col., 1995; Campbell y col., 1997; Sakai y col., 2001). Los AG volátiles, acetato y butirato tienen efecto directo en el colon distal (Scharrer y Lutz, 1990), ya que aceleran la absorción de Ca (Lutz y Scharrer, 1991; Levrat y col., 1991), y un efecto estimulador sobre la mucosa cecal junto con un incremento del flujo sanguíneo en el ciego (Levrat y col., 1991; Younes y col., 1993; Campbell y col., 1997). Sin embargo, el hecho de que lactosa sea capaz de estimular la absorción de Ca en ratas libres de gérmenes (Andrieux y Sacquet, 1982, 1983) y que el maltitol también estimule la absorción de Ca en segmentos de íleon evertidos (Goda y col., 1993), indica que el bajo pH en el intestino no debe ser el único factor relacionado con la absorción de Ca.

Ha sido descrito un aumento del peso del ciego, tanto del contenido como de la pared, en ratas alimentadas almidón resistente (Rémesy y col., 1993) y con diferentes OND (Demigné y col., 1989; Levrat y col., 1991; Hoshi y col., 1994; Ohta y col., 1994; Younes y col., 1996; Kikuchi y col., 1996; Campbell y col., 1997) y del colon con FOS cc (Tokunaga y col., 1986). Este aumento lleva consigo un incremento del área de superficie disponible para la absorción de nutrientes. También se ha sugerido que la presencia de éstos azúcares resistentes osmóticamente activos en el ID debe incrementar la cantidad de fluido dentro del lumen para mantener la isotonicidad (Brommage y col., 1993). Como ya indicó Bronner (1987), este fluido adicional debe aumentar la absorción pasiva del Ca mediante el incremento de la permeabilidad de la unión intercelular entre los enterocitos. De tal manera que la inyección de TOS o lactosa en el ciego produce un aumento significativo del peso de la fase líquida en el lumen intestinal, por lo que la mayor absorción de Ca también puede deberse a este último efecto (Chonan y Watanuki, 1995).

El efecto trófico de los AGCC sobre la proliferación de las células epiteliales del colon ha sido observado tanto en ratas (Koruda y col., 1988; Kripke y col., 1989; Rémesy y col., 1992; Frankel y col., 1994) como en humanos (Scheppach y col., 1992). La hipótesis de que los AGCC producidos de la fermentación de los OND están involucrados en la proliferación de las células epiteliales del colon, se ha visto fortalecido con los hallazgos de proliferación de las células epiteliales del colon tras la administración luminal de AGCC (Sakata y von Englehardt, 1983; Sakata, 1987; Campbell y col., 1997) acompañado de un aumento en el tamaño de las criptas

(Campbell y col., 1997; Ichikawa y Sakata, 1998). El butirato parece ser el más efectivo, actuando como fuente de energía y estimulando así la proliferación celular, con un incremento en la profundidad de las criptas y en la densidad celular (Sakata y von Englehardt, 1983; Campbell y col., 1997). Sin embargo, las bifidobacterias producen sólo una pequeña cantidad de butirato comparado con otras especies (Djouzi y Andrieux, 1997), por tanto estos datos no apoyan la relación causal entre la estimulación de absorción mineral por las bifidobacterias vía butirato. Como ya hemos comentado anteriormente, el gran aumento de la solubilidad de Ca en el ciego permite a este órgano jugar un papel importante en la absorción total de Ca. De hecho, el ciego de la rata tiene la mayor densidad de lugares de transporte de Ca sensibles a los metabolitos de la vitamina D (Nellans y Goldsmith, 1981), pudiendo incrementarse con la hipertrofia cecal (Lopez y col., 1998).

También se ha sugerido que es posible que los AGCC influyan directamente en la absorción de Ca modificando el intercambio de varios electrolitos (Ca-H) (Lopez y col., 1999). Wasserman y col. describieron la producción de un complejo altamente absorbible de Ca-lactato (Wasserman y Lengemann, 1960; Armbrecht y Wasserman, 1976). Trinidad y col. (1993) han sugerido que el Ca podría pasar a través de la membrana celular más fácilmente en forma de complejo menos cargado (acetato de Ca) que el Ca ionizado. De hecho, para neutralizar la elevada concentración de ácido orgánico y mantener un pH cecal en un valor de acidez moderado (cerca de 6), deberían de alcanzar el ciego una cantidad suficiente de minerales. En este sentido, Rémésy y col. (1993) mostraron que la acumulación de sales insolubles de Ca, principalmente de fosfato, jugaban un importante papel como sistema tamponador del pH cecal en ratas alimentadas con inulina. Este complejo de Ca insoluble (carente de efecto osmótico) puede ser efectivo en contrarrestar la acidificación cecal cuando hay una fermentación muy activa. Así, Younes y col. (1996) en ratas alimentadas con almidón digerible observaron que ésta capacidad tamponadora de los contenidos cecales fue muy alta, porque los electrolitos provenientes del íleon se concentraron en un volumen pequeño. En cambio en ratas alimentadas con almidón resistente, la mayor efectividad de la absorción de Ca en el tracto digestivo superior, junto con una dilución del Ca en un gran volumen cecal, dio lugar a una menor concentración de este complejo de Ca y P, y por lo tanto una menor neutralización del pH. Aunque está aceptado que un pH muy ácido (pH 5) inhibe a los microorganismos que metabolizan el ácido láctico (Cummings, 1981), Younes y col. (1996) también observaron una producción notable de ácido láctico a pH 5,7.

Un último mecanismo propuesto es la acción de la calbindin-D9k (CaBP), una proteína de la mucosa intestinal que tiene una gran afinidad por el Ca en el intestino de ratas (Duflos y col., 1996). Ohta y col. (1998c) observaron en ratas que los FOS cc incrementaron los niveles de CaBP en el intestino grueso. Los autores propusieron que el incremento de la concentración luminal de Ca como consecuencia de la fermentación de los FOS cc, podía incrementar el flujo difusivo de Ca en las células de la mucosa intestinal y así mantener la homeostásis local del Ca

en el intestino grueso. Esto sugiere que la existencia de una ruta transcelular, vía CaBP, en el intestino grueso además de la paracelular (Ohta y col., 1998c).

Magnesio. Al igual que ocurría con el Ca, el Mg también es capaz de absorberse desde el colon y el ciego (Karch, 1989a, 1989b; Scharrer y Lutz, 1990; Hardwick y col., 1991). Se ha descrito que los AGCC aceleran la absorción de Mg tanto desde el ciego (Lutz y col., 1991) como desde el colon (Scharrer y col. 1990; Lutz y col., 1991). Ohta y col. (1994b) observaron que la administración de FOS cc disminuyó el pH luminal del colon en ratas cecetomizadas y concluyeron que el efecto estimulante de los FOS cc sobre la absorción de Mg sucede principalmente en el colon o en el colon compensado por la falta del ciego. En estudios posteriores estos autores describieron que la mitad del incremento en la absorción del Ca y Mg inducido por los FOS cc tiene lugar en el colon y recto (Ohta y col., 1995a) y la otra mitad en el ciego (Ohta y col., 1997). En otro estudio, el empleo de 4'-GOS incrementó la absorción de Mg no sólo cuando se infundió en el estómago sino también en los animales que recibieron infusión en el ciego con la misma intensidad que por la administración oral de los GOS, los autores concluyeron que los efectos estimulantes de los GOS fueron ejercidos principalmente en el ciego, con una menor contribución relativa del colon y del recto (Chonan y Takahashi, 1999).

Ha sido descrito, al igual que para el Ca, que el Mg al ser muy poco soluble en las condiciones del intestino grueso *in vivo*, debe encontrarse de forma soluble para ser absorbido a este nivel (Chonan y Watanuki, 1995, 1996). Así pues, el incremento de la producción de AGCC y el consiguiente descenso del pH están asociados con un incremento en la solubilidad del Mg en la fase líquida en el íleon y ciego, por disolución del complejo Ca-Mg-P insoluble cuando las ratas son alimentadas con lactulosa (Heijnen y col., 1993), almidón resistente (Schulz y col., 1993), arabinosilanos (Lopez y col., 1999), FOS cc (Ohta y col., 1994a) o con 4'-GOS (Chonan y col., 1996a). Además, Ohta y col. (1993) demostraron que había una correlación significativa entre la AA de Mg y la concentración de lactato en el ciego, y Scharrer y Lutz. (1990) sugirieron que el butirato afectaba a la absorción de Mg en el colon. También se ha propuesto que el efecto del almidón resistente en la absorción cecal de Mg podría estar relacionado con la hipertrofia cecal, y probablemente hay un efecto específico de los AGCC en la absorción pasiva de Mg (Scharrer y Lutz, 1992; Younes y col., 1996), actuando en el mismo un sistema de intercambiadores de protones (incluido Mg-H) necesario para la absorción de los AGCC (Lutz y col., 1991).

En el intestino grueso podría ocurrir lo mismo que en el delgado, donde se ha descrito cierta competitividad entre la absorción de Ca y Mg (Brink y col., 1992) pero con mecanismos independientes (Karch y Remmel, 1990; Hayasi y Hoshi 1992), ya que ha sido demostrado que el incremento del consumo de Ca ó P puede perjudicar la AA de Mg (Ohta y col., 1994a) debido a la formación de un complejo insoluble de Ca-Mg-P en el lumen intestinal (Brink y col., 1992), sin embargo la administración de FOS cc es capaz de incrementar la absorción de Mg.

Fósforo. Se ha demostrado que el Ca de la dieta tiene un marcado efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de fosfato, y además en ratas hay una relación inversa entre la

absorción de fosfato y el contenido en Ca de la dieta (Draper y col., 1972; Anderson y Draper, 1972). En un estudio con ratas alimentadas con una cantidad elevada de P (1,3%) la absorción intestinal y excreción urinaria de fosfato fueron significativamente más elevados cuando el contenido en Ca de la dieta fue bajo (0,2%) que cuando fue normal (0,6%), y esta diferencia se asoció con la formación de fosfato cálcico insoluble en el tracto GI (Schaafsma y Visser, 1980).

Sin embargo, Ohta y col. (1993) observaron que la alimentación con FOS cc a ratas estimuló significativamente la AA de P, encontrando una correlación positiva entre la absorción mineral y la concentración de L-lactato en el colon. En otro estudio, Ohta y col. (1997) observaron que la absorción de P en ratas con infusión de Ca y Mg en el ciego fue mayor que cuando se realizó en el estómago, mientras que la retención de P disminuyó con la ingestión de FOS cc, siendo menor en la ratas con infusión en el ciego. Una explicación a esto hecho es la posible formación de un complejo insoluble Ca-P-Mg en el lumen (Brink y col., 1992), que se estimula con una alimentación elevada en P, descendiendo la absorción de estos minerales. Por tanto y como únicamente ha sido propuesto un mecanismo de absorción de P en el ID (Birge y Aviol, 1981), la inhibición de la absorción de P podría reflejar la formación de un complejo insoluble de la sal de P con el Ca y Mg en el ID. En un estudio más reciente, Ohta y col. (1998b) observaron que la absorción de P se incrementó en ratas gastrectomizadas, usando como fuente de P el fosfato potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) que es soluble en agua, sin embargo la adición de FOS cc tampoco estimuló la absorción de P por encima del grupo control como ocurrió con el Ca.

Hierro. Se ha observado que en el intestino grueso se absorbe el Fe suficiente para que las ratas se recuperen de una anemia (Ebihara y Okano, 1995). El ciego juega un importante papel en el mecanismo por el que los FOS cc previenen la anemia postgastrectomía (Ohta y col., 1998a, 1999), aunque al parecer la absorción de Fe no sólo tiene lugar en ciego sino también en el colon y recto (Sakai y col., 2000). Al igual que ocurría con los otros minerales, la solubilización del Fe es esencial antes de que pueda ser absorbido en el lumen intestinal (Monsen y Cook, 1976). Ohta y col. (1995b) en ratas anémicas observaron un aumento en la absorción del Fe, indicando como responsables de tal efecto a los ácidos orgánicos como el lactato y los AGCC producidos por las bacterias del lumen a partir de la fermentación de los FOS cc, ya que el lactato forma un pequeño complejo molecular absorbible con Fe férrico (Derman y col., 1980).

Ohta y col. (1995a) relacionaron la absorción de Fe (pirofosfato férrico) en ratas anémicas alimentadas con FOS cc con la disminución del pH del contenido del ciego y un incremento de la concentración de Fe en la fase soluble del mismo. Posteriormente Ohta y col. (1998a), utilizaron un compuesto soluble (citrato de Fe) en ratas gastrectomizadas y argumentaron que sin el efecto del ácido gástrico, para que el Fe fuera absorbido éste debió ser cambiado en otra forma química insoluble en el intestino (sal de fosfato), como un paso intermedio que permita su unión a proteínas (mucina) con las que formar complejos solubles

fácilmente absorbibles. Conrad y col. (1993) propusieron que la ruta de transporte de Fe en el intestino consiste en varias proteínas fijadoras de Fe incluyendo mucina, integrina, mobilferrina y ferritina. Una vez que se ha formado el complejo Fe-mucina, mantiene el Fe en forma soluble tras la alcalinización del lumen y por tanto facilita la absorción del Fe. Otra explicación es que el Ca y Fe puedan competitivamente unirse a una o más sustancias que son importantes en la ruta de absorción transcelular (Hallberg y col., 1991), puesto que en las ratas algunas proteínas duodenales como la mobilferrina y calreticulina tienen afinidad por Ca y Fe (Conrad y col., 1993). Estas proteínas también se encuentran en el intestino grueso (Petith y col., 1979). Junto a estos mecanismos de absorción, Ohta y col. (1998a) observaron que los FOS cc incrementaron la absorción del Ca en ratas gastrectomizadas, de manera que si los FOS cc estimulan la absorción de Ca por una ruta independiente a la de la absorción del Fe, como la ruta paracelular, los FOS cc podrían reducir el efecto inhibitorio del Ca sobre la absorción de Fe.

También se ha demostrado un efecto estimulante de los FOS cc en la absorción de Fe, en ratas anémicas postgastrectomía alimentadas con una fuente de Fe hemo, mediante el descenso del pH en los contenidos cecales y el incremento en la concentración de Fe en la fracción soluble de los mismos. Sin embargo, este efecto estimulante fue más débil que en el caso del Fe no hemo y no se observó ningún efecto en ratas normales (Ohta y col., 1999). En otro estudio con ratas normales alimentadas con almidón resistente, el aumento significativo en la absorción de Fe se relacionó con un incremento en el área de intercambio (aumento del ciego y mayor tiempo de tránsito) y la elevación del flujo sanguíneo del ciego (Lopez y col., 1998).

Efecto sobre la mineralización ósea. Uno de los objetivos principales que se busca en la administración de OND a la dieta es que la estimulación de la absorción mineral se traduzca en una deposición de estos minerales en el hueso, especialmente en las etapas de crecimiento. Los FOS y GOS han sido los más estudiados en este sentido y a continuación se describen los datos más relevantes.

En ratas jóvenes (Chonan y col., 1995) y adultas (Scholz-Ahrens y col., 2001a; Scholz-Ahrens y Schrezenmeir, 2002) ovariectomizadas, usadas como modelo de mujeres postmenopáusicas, los GOS y la oligofructosa previnieron de forma efectiva la pérdida de contenido mineral óseo, y el contenido en Ca del fémur y tibia fue un 10% mayor en las ratas alimentadas con los GOS (Chonan y col., 1995). Sin embargo, mientras que la ingestión de 5% de oligofructosa previno de la pérdida ósea en el fémur en presencia de Ca dietético elevado (1%), se necesitó un 10% de oligofructosa para incrementar significativamente la mineralización ósea con 0,5% de Ca (Scholz-Ahrens y col., 2001a; Scholz-Ahrens y Schrezenmeir, 2002). En ratas gastrectomizadas los FOS cc también aumentaron la absorción de Ca, y previnieron el descenso de contenido cálcico en el fémur y la densidad ósea mineral como consecuencia de la osteopenia que sobreviene a una gastrectomía (Ohta y col., 1998a,1998b). Igualmente en ratas normales los 6'-GOS incrementaron el contenido de Ca en fémur y tibia cuando el contenido de Ca en la dieta fue normal (0,5%), mientras que cuando

éste fue bajo (0,05%) no se observó ningún efecto sobre la mineralización ósea (Chonan y Watanuki, 1996).

Así pues, el contenido en la dieta de Ca puede ser importante a la hora de que los OND puedan tener o no efecto sobre su deposición en el hueso. Rémésy y col. (1993) observaron que la concentración de Ca soluble en el ciego fue superior si se añadía inulina a una dieta con concentración elevada de Ca (0,8%), y se correlacionó con la cantidad de Ca absorbido desde el ciego.

En ratas ovariectomizadas se ha observado un efecto dosis-dependiente con la administración de inulina en el incremento de la absorción de Ca, y consecuentemente en el incremento de la densidad mineral ósea (Scholz-Ahrens y Schrezenmeir, 2002). Posteriormente, estos autores describieron que la persistencia del efecto de mineralización del hueso mediado por oligofructosa dependió de la parte del esqueleto medida. En el fémur, la prevención de la desmineralización mediante el empleo de oligofructosa fue más pronunciado tras ocho semanas y se perdió significación tras dieciséis semanas de haber sido ovariectomizadas (Scholz-Ahrens y col., 2001b).

### **7.5.2. Estudios en humanos**

En voluntarios ileostomizados la ingestión de inulina y oligofructosa no modificó el tránsito de Ca, Mg, Zn y Fe desde el íleon hacia el colon, sugiriendo que la absorción mineral tiene lugar en el colon (Ellegård y col., 1996). Van Dokkum y col. (1995) mediante una técnica de isótopos estables, no observaron ningún efecto de los OND sobre la absorción mineral en hombres jóvenes tras la toma de 15 g de inulina, oligofructosa o GOS al día durante 3 semanas, debido según los autores al corto periodo de tiempo (24 h) en la recogida de las muestras. En un estudio posterior, las muestras fueron recogidas a las 36 h de la administración del isótopo, se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la absorción de Ca con el empleo de oligofructosa (van den Heuvel y col., 1999b). Coudray y col. (1997) también observaron un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) en la absorción de Ca en voluntarios que tomaron inulina durante 4 semanas, sin embargo no se mostraron efectos en la absorción de Mg, Fe y Zn. van den Heuvel y col. (1999a) investigaron la absorción de Ca en un estudio con mujeres postmenopáusicas, observando una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) en la absorción entre el grupo control y el alimentado con 10 g de lactulosa. Un estudio reciente (Abrams y Griffin, 2001) con una dieta relativamente alta en Ca (1.500 mg/día), y con consumo de inulina y oligofructosa durante 3 semanas, reveló un incremento del 18% en la fracción real de la absorción de Ca y un incremento absoluto del Ca absorbido de 90 mg/día.

Mecanismo por el que los OND aumentan la absorción mineral. Como ya hemos visto con las ratas, el mecanismo por el cual se estimula la absorción mineral está probablemente relacionado con el incremento de la solubilidad de estos minerales en el ciego y el colon como consecuencia del aumento de la fermentación microbiana y descenso del pH del lumen. En el

hombre debería de ocurrir algo parecido ya que como anteriormente se ha descrito el efecto estimulante de los OND sobre la absorción mineral es debido principalmente a su carácter prebiótico, al ser fermentado selectivamente por los microorganismos del colon con consecuencias beneficiosas para la salud del hospedador (Gibson y Roberfroid, 1995; Roberfroid y col., 1998;). Sin embargo, debido a que la fisiología del aparato digestivo de la rata es diferente de la humana, el segmento del ciego, que está prácticamente ausente en los humanos, juega un papel importante en la absorción mineral de los roedores (Rayssiguier y Rémésy, 1988). En los humanos se sabe que los minerales como el Ca, P y Mg además de en el ID, también se absorben de forma efectiva desde el colon (Sellin y col., 1984; Colette y col., 1986). Además Flourie y col., (1985) y Cummings y col., (1987) observaron una fermentación más activa en el colon de los humanos con un mayor valor de AGCC y un menor pH luminal, requisito para la estimulación de la absorción de Ca en el colon humano (Trinidad y col., 1993).

Varios son los estudios que demuestran que los OND (oligofruktosa, TGOS, inulina y GOS) alcanzan el colon intactos (Alles y col., 1997; Bouhnik y col., 1997) y allí son fermentados de forma específica por las bifidobacterias del colon, aumentando su número en la muestras fecales, sin modificar el pH fecal y el recuento de otros géneros bacterianos como las enterobacterias (Bouhnik y col., 1997; Kleessen y col., 1997; Djouzi y Andrieux, 1997), o por el contrario disminuyendo el número de bacteroides y clostridios (Ito y col., 1993; Gibson y col., 1995). Sin embargo, otros autores (Scholz-Ahrens y col., 2001) consideran todavía escasas las evidencias de esta especificidad, y proponen que el principal efecto de los prebióticos responsable de la mayor absorción mineral en humanos está relacionado con su efecto como "comida del colon". Es decir, que ésta sirve como substrato para la flora intestinal de una forma inespecífica pero que podría estimular la tasa de fermentación, producción de AGCC y acidificación luminal. Sin embargo, y como se ha mencionado anteriormente no se ha encontrado un claro efecto de los OND sobre el pH fecal y concentración o proporción de AGCC. Esta falta de relación clara podría explicar parcialmente la menor estimulación de la absorción mineral por estas sustancias en los humanos con relación a los animales. Otra explicación que dan estos mismos autores es la corta duración de los estudios en humanos, haciendo imposible extrapolar a corto plazo los efectos de los OND en la absorción mineral sobre el desarrollo del esqueleto o salud del hueso, por lo que se requieren estudios a más largo plazo.

Otro aspecto que tampoco está claro en el hombre es que el efecto dosis-dependiente de los prebióticos sobre la absorción de algunos minerales pueda estar relacionado con la capacidad estimulante sobre las bifidobacterias del substrato. Así, Roberfroid y col (1998) concluyeron que aunque no había relación dosis-efecto en el rango de 4 a 20 g/día de inulina y oligofruktosa, esta cantidad era suficiente para estimular el crecimiento de estas bacterias. Hasta ahora no está claro si existe un efecto dosis-dependiente de los prebióticos sobre la absorción mineral asociada con un efecto dosis-dependiente en el crecimiento de bifidobacterias. No obstante, una variable que se puede correlacionar con estos incrementos es el número inicial de bifidobacterias en heces, independientemente de la dosis de los FOS, ya

que se ha observado que cuando el número inicial de bifidobacterias es más bajo se produce el mayor incremento de estas bacterias cualquiera que sea la dosis diaria de FOS empleada (Roberfroid y Delzenne, 1998).

## 7.6. Métodos para evaluar el potencial de los prebióticos

Los OND son considerados como los substratos prebióticos más importantes ya que cumplen los criterios actuales para que un ingrediente sea clasificado como prebiótico (Gibson y Roberfroid, 1995), incluyendo la capacidad de modular beneficiosamente la flora intestinal. Sin embargo, se hace imperativo que se puedan utilizar métodos seguros para determinar su eficacia. A continuación se muestran las técnicas que actualmente se emplean con este fin.

Estudios en cultivos puros. Estos estudios se llevan a cabo con bifidobacterias y lactobacilos (Yazawa y col., 1978) en cultivo puro con OS y PS, comparando el crecimiento con otras cepas bacterianas. También se han llevado a cabo cultivos mixtos en los que cepas intestinales seleccionadas han sido usadas para determinar la actividad prebiótica en cocultivo (Djouzi y col., 1995). Estas técnicas introducen algún elemento de competición entre los organismos, pero de nuevo no se asemeja de forma adecuada a las complejas interacciones de la microflora intestinal humana que comprende aproximadamente unas 500 especies.

Fermentaciones *in vitro* con cultivos mixtos. Los fermentadores *in vitro* más simples son cultivos estáticos cerrados en los que el substrato es limitado y por tanto es sólo apropiado en experimentos que lleven poco tiempo (Wang y Gibson, 1993). Un método más fisiológico es un cultivo continuo, en el que variando la proporción de la dilución y otros parámetros se pueden determinar las condiciones óptimas para el crecimiento (Gibson y Wang, 1994b). Los cultivos semicontinuos consisten en ir añadiendo el medio, y el cultivo gastado se elimina a intervalos específicos (Rumney y Rowland, 1992). Los fermentadores de fase múltiple se han empleado como modelos intestinales efectivos. Este sistema consiste en tres vasos alineados en sucesión, el primero rico en nutrientes, de tránsito rápido y condiciones ácidas, el tercero con menos substrato, de tránsito lento debido a un mayor volumen operativo y condiciones de pH neutro (Gibson y Wang, 1994b), mientras que el segundo presenta unas condiciones intermedias entre los dos anteriores. Como resultado, el primero imita el colon proximal, el segundo el colon transversal y el tercero simula el colon distal. Los fermentadores continuos de cinco fases también se han usado para simular el tracto intestinal desde el yeyuno hasta el colon descendente (Molly y col., 1993). Aunque los fermentadores de cultivos continuos son herramientas razonables de fermentación, no pueden imitar completamente el ambiente del colon, y su principal inconveniente es la falta de potencial de absorción.

Métodos *in vivo*. Los animales, a menudo ratas o ratones, se han utilizado para determinar la naturaleza prebiótica de un substrato (Campbell y col., 1997; Kullen y col., 1998). Ratas gnotobióticas (libres de gérmenes) o aquellas inoculadas con uno o un número limitado de organismos pueden ser usadas para investigar las interacciones entre el hospedador y los

microorganismos, aunque el ecosistema resultante difiera de la situación normal en el intestino humano (Valette y col., 1993; Djouzi y col., 1995). Las ratas, conocidas como ratas con flora humana asociada, pueden dar una mayor representación de la situación del intestino humano, aunque la fisiología intestinal no sea la misma (Rowland y Tanaka, 1993). También se han llevado a cabo estudios con personas, aunque los distintos estudios mostraron diferencias en la dosis administrada, la duración del estudio y las características de los voluntarios (Ito y col., 1990; Gibson y col., 1995; Kleessen y col., 1997b; Bouhnik y col., 1997).

Caracterización bacteriana. La microflora bacteriana ha sido detectada usando métodos fenotípicos y bioquímicos de identificación clásicos. Sin embargo, además de llevar tiempo y ser laboriosos, son de baja resolución ya que están limitados por el medio de cultivo usado y no son completamente selectivos para los organismos deseados. La llegada de técnicas moleculares ha permitido cambiar esta situación mediante el empleo de herramientas con mayor poder discriminatorio y fiabilidad. El interés actual se está centrando en extraer el ADN de colonias puras obtenidas mediante técnicas clásicas de cultivo, amplificándolo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para secuenciar finalmente el ARNr 16S y compararlo entonces con bases de datos (Wilson y Blichington, 1996). Las sondas de oligonucleótidos específicas de género y especie han sido desarrolladas recientemente. La hibridación con fluorescencia *in situ* es quizás el método mejor conocido, mediante el cual sondas marcadas con fluorescencia específicas de género hibridan el ARNr de un género particular (bifidobacteria en células fijadas sobre superficie microscópica) y las células con fluorescencia son cuantificadas (Langendijk y col., 1995). El interés actual se está dirigiendo hacia el diseño de sondas genotípicas, que hibridan específicamente una única secuencia(s) del ARNr 16S del microorganismo que queremos identificar. Así, una sonda de oligonucleótido, específica para una cepa probiótica, puede ser marcada con una proteína fluorescente, y por tanto ser usada para marcar el probiótico, facilitando así la diferenciación de la bifidobacteria y lactobacilo del hospedador. Las sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente haciendo blanco en la secuencia específica de ARNr 16S para un género bacteriano, han sido utilizadas por Welling y col. (1997) para caracterizar la composición de una muestra de bacterias fecales (Rycroft y col., 1999).

### **7.7. Empleo de oligosacáridos (OS) frente a la fibra dietética (FD)**

La FD es un componente de la dieta normal, ampliamente aceptado como una parte importante de la nutrición sana. Se ha propuesto una definición de la FD basada en un criterio fisiológico/nutricional (Bär, 1993; British Nutrition Foundation, 1990) como: "aquella parte de los oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados (hidrofílicos), que no puede ser descompuesta en componentes absorbibles por las enzimas digestivas humanas en el estómago e ID, incluyendo la lignina". Según esta definición de la fibra, ésta puede dividirse en PS no almidón, oligosacáridos no digeribles, almidón resistente y lignina.

El hecho de que los OS no sean digeridos por los jugos digestivos del hombre podría calificarlos como FD de bajo peso molecular, no formadora de viscosidad y solubles en agua. Los beneficios para la salud de la ingestión de OS son también semejantes a los desarrollados por la FD. Sin embargo, los OS no poseen los efectos físicos de la FD, tales como el incrementar la viscosidad, retención de agua y efectos de volumen. La contribución a la salud de los OS proviene de su característica de ser fermentada (factor de crecimiento de bifidobacterias). Las ventajas que los OS tienen sobre la FD es un requerimiento diario menor (3 g/día), no causan diarrea a las dosis recomendadas, son ligeramente dulces, no tienen ni mal sabor ni textura, son completamente solubles en agua, no dan viscosidad, no retienen minerales, son físicamente estables y son más fácilmente incorporados en comidas y bebidas procesadas (Tomomatsu, 1994).

### **7.8. Dosis y efectos secundarios**

La dosis diaria efectiva de OS (en forma pura) es de 3 g de FOS, 2-2,5 g de GOS, 2 g de SOS y 0,7 g de XOS. La máxima dosis que no produce diarrea de SOS es de 0,64 g/kg para hombres y 0,96 g/kg para mujeres (Hata y col., 1989), y la dosis mínima de FOS requerida para inducir diarrea es de 44 g para hombres y 49 g para mujeres (Spiegel y col., 1994).

Los GOS generalmente han sido reconocidos como seguros ó GRAS, debido al hecho de que son componentes de la leche humana y del yogurt tradicional, y son producidos a partir de la lactosa ingerida por bacterias intestinales residentes que producen  $\beta$ -galactosidasa. En pruebas de toxicidad aguda y crónica en ratas, la ingestión oral de GOS a razón de 20 g/kg de peso corporal administrada en una sola dosis, y de 1,5 g/kg de peso corporal durante 6 meses, no ha mostrado toxicidad. Tampoco se encontró mutagenicidad en la prueba de mutación microbiana de Ames, ni genotoxicidad en el ensayo de la reparación por recombinación de Rec. El único efecto adverso conocido de los GOS es a lo sumo una diarrea transitoria debido a la llamada "diarrea osmótica", que ocurre cuando se consume un exceso de GOS. La cantidad de GOS que no produce diarrea osmótica se estima que es aproximadamente 0,3-0,4 g/kg de peso corporal o alrededor de 20 g por persona (Sako y col., 1999).

## 8. SIMBIÓTICOS

Los simbióticos se definen como la mezcla en un único producto de probióticos y prebióticos que afectan beneficiosamente al hospedador, mediante la mejora de la supervivencia y la implantación de los microorganismos vivos en el tracto GI añadidos en la dieta. Dicha implantación promueve la estimulación selectiva del crecimiento y/o activación del metabolismo de uno o un número limitado de bacterias promotores de la salud, mejorando así el bienestar del hospedador (Gibson, y Roberfroid, 1995).

Esta combinación podría mejorar la supervivencia del microorganismo probiótico ya que su substrato específico se encuentra fácilmente disponible para su fermentación. Por ello se podría esperar que el substrato prebiótico confiriera protección al microorganismo durante su tránsito por el tracto GI superior frente a la acidez gástrica (la eficacia en la protección depende de los constituyentes en azúcar del prebiótico y tipo de partes del enlace) y contra el ataque proteolítico de las proteasas gástricas y pancreáticas, probablemente a través de los mecanismos de revestimiento de la superficie del probiótico e impedimento estérico. No obstante, estos mecanismos deben ser todavía investigados (Mountzouris y col., 2002).

Ejemplos de simbióticos empleados son la combinación de bifidobacterias con FOS, lactobacilos con lactitol y de bifidobacterias con GOS (Collins y Gibson, 1999). Los estudios que evalúan la estimulación del crecimiento de las bifidobacterias intestinales tras la ingestión de simbióticos son todavía escasos. Recientemente, Bielecka y col. (2002) demostraron que la administración de *B. longum* o *B. adolescentis* junto con oligofruktosa al 5% a ratas durante 14 días aumentó el número de bifidobacterias en heces en 1,4 log ufc/g respecto al grupo control. Sin embargo, no mostró diferencias respecto al empleo único de oligofruktosa en la dieta (1,6 log ufc/g).

En cuanto a los efectos descritos en la bibliografía sobre la salud humana tras la administración de simbióticos, hay que destacar la actividad antiinfecciosa y la colonización intestinal por bifidobacteria tras la administración de *B. breve* con OS 6'-transgalactosilados. Esta combinación se mostró efectiva frente a la infección oportunista de un patógeno con resistencia antibiótica como fue *Salmonella enterica* serovar. *Typhimurium* (Asahara y col., 2001).

También se ha descrito la mejora de la función intestinal en una niña con síndrome de intestino corto. Este conjunto de síntomas se observa en pacientes que han sufrido una resección masiva del intestino dando lugar a un intestino dilatado y un sobrecrecimiento bacteriano en el mismo (Vanderhoof y col., 1998). Kanamori y col. (2001) administraron una terapia simbiótica consistente en *B. breve*, *L. casei* y GOS durante un mes. Tras este tiempo detectaron que las heces contenían un gran número de los probióticos administrados, así como otras especies de bifidobacterias y lactobacilos. Así mismo, se observó una reducción de los niveles en heces de *E. coli* y *Candida* durante el tratamiento.

## 9. PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS EN LA ALIMENTACIÓN INFANTIL

El hecho de que las bifidobacterias lleguen a ser predominantes en los bebés alimentados con lactancia materna, como anteriormente se ha descrito, ha provocado que la industria esté evaluando los métodos que hacen que la flora GI de los bebés alimentados con fórmula sea comparable a la de los alimentados a pecho. Sin embargo, no está claro si esta diferencia tiene alguna consecuencia a largo plazo con un significado clínico y exactamente durante cuanto tiempo persiste esta diferencia (Vandenplas, 2002).

En la industria alimentaria, la composición y estructura de los OS de la leche humana no pueden ser reproducidas, y por lo tanto no están disponibles comercialmente. Por ello se emplea otro tipo de OS de origen animal y vegetal (como FOS y GOS) en la alimentación infantil, tratando de obtener los efectos potencialmente beneficiosos de los OS de la leche humana (Rivero-Urgell y Santamaria-Orleans, 2001).

Algunas compañías tratan de imitar el patrón de colonización GI de los bebés alimentados con lactancia materna mediante la adición de lactobacilos y/o bifidobacterias a las fórmulas infantiles, mientras que otras tratan de imitar a la leche materna y añaden OS a la fórmula para obtener el mismo efecto que la leche materna tiene en la colonización GI durante los primeros meses de vida (Vandenplas, 2002). Existen varios productos en el mercado que contienen FOS y GOS en su composición y se venden dentro del campo pediátrico, como fórmulas infantiles de continuación en el mercado japonés y europeo o los alimentos infantiles basados en los cereales (Rivero-Urgell y Santamaria-Orleans, 2001).

La adición de bifidobacterias a la fórmula infantil da lugar a una flora GI dominada por bifidobacterias comparable a la de los bebés alimentados con leche materna (Pahwa y Mathur, 1987; Langhendries y col., 1995). También cambian algunos aspectos típicos de los bebés alimentados con lactancia materna como el aspecto y pH de las heces (Pahwa y Mathur, 1987). Las BAL se han empleado en el uso profiláctico y terapéutico contra la diarrea en bebés prematuros (Millar y col., 1993), recién nacidos (Sepp y col., 1993) y niños (Saavadra y col., 1994; Majamaa y col., 1995). Estas observaciones nos conducen a la conclusión de que "la teoría probiótica" es válida y que la flora GI puede ser manipulada añadiendo bifidobacterias a las fórmulas infantiles. Sin embargo, este concepto puede ser visto como "poco fisiológico" ya que las bifidobacterias no están presentes en la leche humana. Otro aspecto desfavorable de este concepto es que las bacterias necesitan ser administradas de forma viable, y por tanto necesitan una serie de recomendaciones durante la preparación de la fórmula. Otra razón que se nos imponen a la hora de realizar una cuidadosa selección de las cepas utilizadas es la de evitar posibles daños colaterales como actividades metabólicas perjudiciales, infecciones sistémicas, efectos desfavorables sobre la inmunomodulación y transferencia génica (de genes resistentes a antibióticos que están codificados por plásmidos) (Ballabriga, 1998). A su favor se debe decir que la adición de probióticos a las fórmulas ha mostrado un descenso en la

incidencia y severidad de los episodios de diarreas infecciosas, tales como las producidas por rotavirus en los niños hospitalizados (Saavedra, 2000).

En el concepto prebiótico, los OS (FOS y/o GOS) son añadidos a las fórmulas, lo que indica en principio un procedimiento más fisiológico y no se necesitan recomendaciones especiales en la preparación de las fórmulas. Pero, por supuesto, los aspectos dinámicos del contenido de OS de la leche de la madre no pueden ser imitados en la lactancia artificial. Se ha demostrado que la adición de OS (GOS+FOS) a la fórmula infantil da lugar a un efecto similar en la colonización GI, convirtiéndose las bifidobacterias en la flora predominante (Boehm y col., 2002; Moro y col., 2002). El número absoluto de bifidobacterias y la proporción de las mismas en el porcentaje de microorganismos totales se incrementa con fórmulas complementadas con prebióticos (Boehm y col., 2002). Consecuentemente se ha observado que el número de lactobacilos también se incrementa significativamente (Moro y col., 2002).

Tal y como se ha descrito en el apartado 7.3. de la presente sección, hay suficientes indicios para asegurar que los OS tienen la capacidad de descender los niveles de COL y el peso corporal. Sin embargo, hasta ahora los efectos sobre el COL plasmático no han sido evaluados en niños mediante la adición de los OS a fórmulas infantiles. Por el contrario, y aunque los datos de ganancia de peso son todavía limitados, la ganancia de peso en niños alimentados con fórmula infantil con y sin OS parece similar. Debido a que los OS son compuestos que no se encuentran de forma natural en los alimentos infantiles (excepto los OS de la leche materna), resulta primordial evaluar que los aspectos de seguridad de los OS en las fórmulas infantiles, aunque estos ya hayan sido reconocidos de forma general como sustancias seguras (Vandenplas, 2002).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

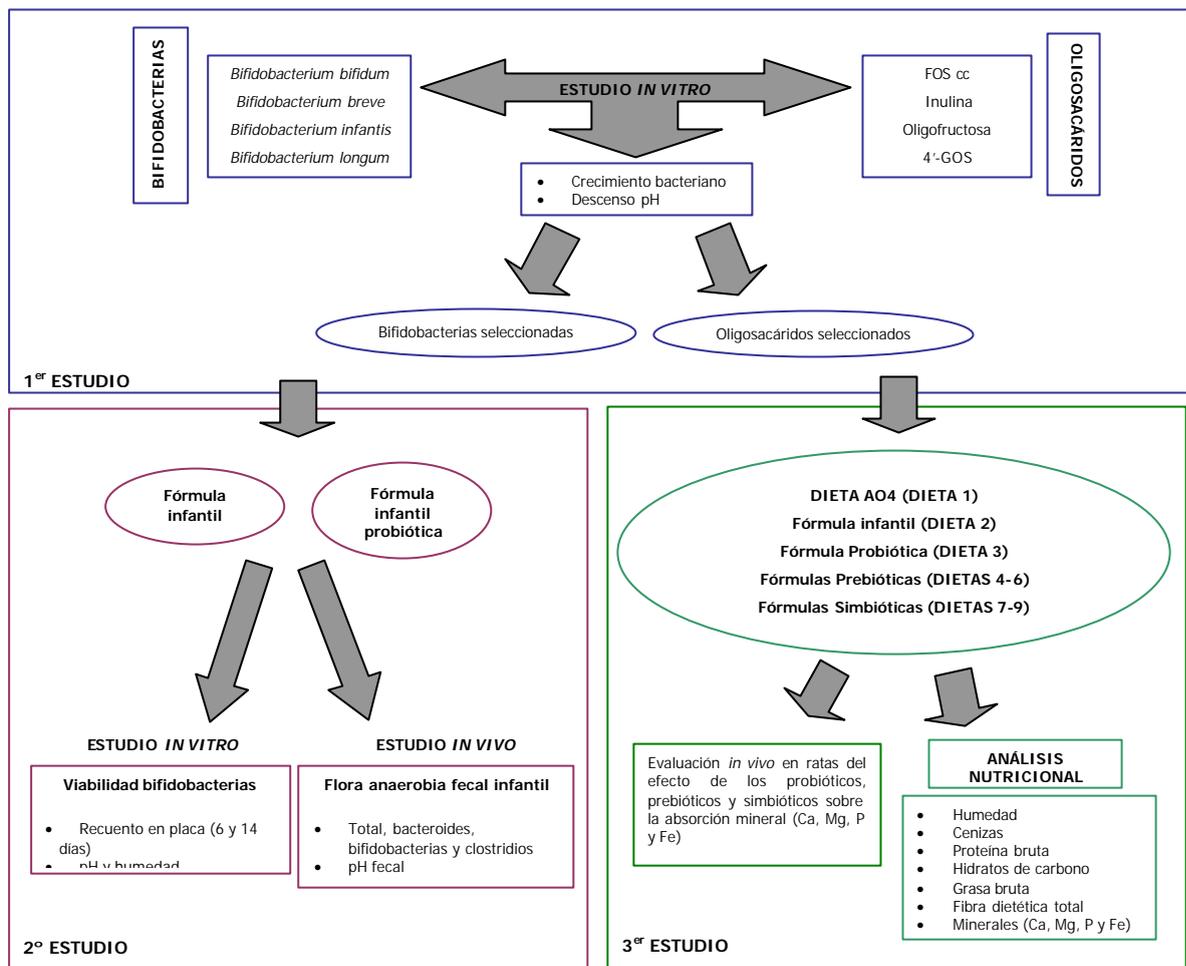
### **1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El desarrollo del trabajo experimental se llevó a cabo en tres estudios, tal y como muestra la Figura 8.

En el primer estudio del trabajo (zona en color azul de la Figura 8) se procedió a evaluar el crecimiento *in vitro* de las especies de *Bifidobacterium* (Punto 2.2 de la presente sección), que con mayor frecuencia se aíslan de las heces infantiles según la bibliografía científica, sobre diferentes hidratos de carbono constituidos por OND (Punto 2.3 de la presente sección) con el fin de seleccionar el substrato más adecuado para ser incorporado a la dieta evaluada en el tercer estudio.

En el segundo estudio (zona en color granate de la Figura 8) se seleccionó una fórmula infantil comercial probiótica con las mismas bifidobacterias seleccionadas en el estudio previo. Se comprobó la viabilidad de las bifidobacterias de la fórmula infantil durante los periodos de tiempo mínimo (seis días) y máximo (catorce días) en los que, según las recomendaciones del fabricante y dependiendo de la edad del lactante, se consumiría la fórmula. Tras comprobar la estabilidad de los fermentos lácticos en dichos periodos, se realizó un estudio con dos grupos de niños a los que se les administró una fórmula infantil normal o la fórmula infantil probiótica desde el 4º mes hasta el año de edad. Fueron realizados recuentos microbiológicos de la flora anaerobia fecal en los meses 1, 3, 5, 7, 9 y 12 con el fin de evaluar el efecto de la fórmula probiótica sobre la flora fecal infantil.

En el tercer estudio (zona en color verde de la Figura 8), y a partir de los OS seleccionado en el 1º estudio y las fórmulas infantiles normal y probiótica del segundo, se elaboraron un total siete dietas. Los OS fueron añadidos a la concentración de 1,2, 5 y 10% en ambas fórmulas infantiles dando lugar a tres dietas prebióticas y tres dietas simbióticas, más la dieta formada por la fórmula probiótica. La fórmula infantil normal sin adición de OS ni bifidobacterias se empleó como control, y por último otra dieta de mantenimiento para ratas, denominada AO4 se empleó como referencia para comprobar el normal desarrollo de los animales durante el periodo de ensayo. Todas las dietas fueron analizadas para determinar su composición nutricional y posteriormente se realizó un estudio *in vivo* con animales de laboratorio con el fin de evaluar el efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos añadidos en las fórmulas infantiles sobre la absorción intestinal mineral. Para ello fueron realizados los siguientes estudios: balance mineral de Ca, Mg, P y Fe, estructura histológica del ciego y colon, contenido mineral en la fase sólida y líquida de los contenidos del ciego y colon, contenido mineral en el fémur y tibia; y contenido en bifidobacterias de las heces de las ratas tras 30 días alimentadas exclusivamente con las nueve dietas empleadas (Figuras 14 y 15).



**Figura 8.** Representación gráfica del diseño experimental del presente estudio de investigación

## 2. MATERIALES

### 2.1. Alimentos problema

#### 2.1.1. Fórmulas infantiles

Para la realización del presente estudio se tomaron como base dos tipos de fórmulas infantiles comerciales, denominadas Leche 2 de continuación y Leche 2 de continuación probiótica, cuyo consumo está indicado a partir del 4º mes de edad y hasta los tres años. Ambas fórmulas poseen el mismo procesado (Figura 9) y los mismos ingredientes (ver Tabla 14), diferenciándose sólo en que la leche de continuación probiótica posee los fermentos lácticos *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* en su formulación. Las bifidobacterias son añadidas al producto final en una atmósfera protectora, rica en N<sub>2</sub>, para evitar la presencia de O<sub>2</sub> que provocaría tanto una oxidación del producto como una menor supervivencia de los microorganismos. Las muestras empleadas en este estudio pertenecieron al mismo lote de producción fabricado por Hero España S.A.

El Consejo de las Comunidades Europeas estableció en 1991 el cambio de nombre de este tipo de alimentos infantiles, pasando la denominación tradicional de *fórmula infantil de continuación* a llamarse *leche de continuación*. Sin embargo, y para evitar cualquier confusión y simplificar la terminología, hemos preferido continuar empleando el nombre de *fórmula infantil* en el del trabajo sin la especificación de “de continuación”, puesto que la *fórmula de inicio* no se ha empleado.

**Tabla 14.** Ingredientes de Leche 2 de continuación y Leche 2 de continuación probiótica

| Ingredientes  | Leche 2 continuación | Leche 2 continuación probiótica |
|---|----------------------|---------------------------------|
| Leche desnatada   | +                    | +                               |
| Suero lácteo desmineralizado                                | +                    | +                               |
| Dextrinomaltosa   | +                    | +                               |
| Aceites vegetales   | +                    | +                               |
| Lactosa   | +                    | +                               |
| Lecitina  | +                    | +                               |
| Minerales (añadidos individualmente)*                       | +                    | +                               |
| Vitaminas (añadidas en forma de mix)                        | +                    | +                               |
| Fermentos lácticos ( <i>B. bifidum</i> y <i>B. longum</i> ) | -                    | +                               |
| Taurina   | +                    | +                               |
| Inositol  | +                    | +                               |
| Colina  | +                    | +                               |
| Carnitina   | +                    | +                               |

\* El contenido mineral (expresado en mg/100 g) consta de: Fosfato bisódico 160 mg; Cloruro cálcico 320 mg; Citrato cálcico 320 mg; Citrato potásico 840 mg; Sulfato de cinc 7,7 mg; Sulfato de cobre 0,96 mg; Sulfato ferroso 42,88 mg; Yoduro potásico 0,04 mg; Hidróxido magnésico 33 mg; Cloruro de colina 80,4 mg.

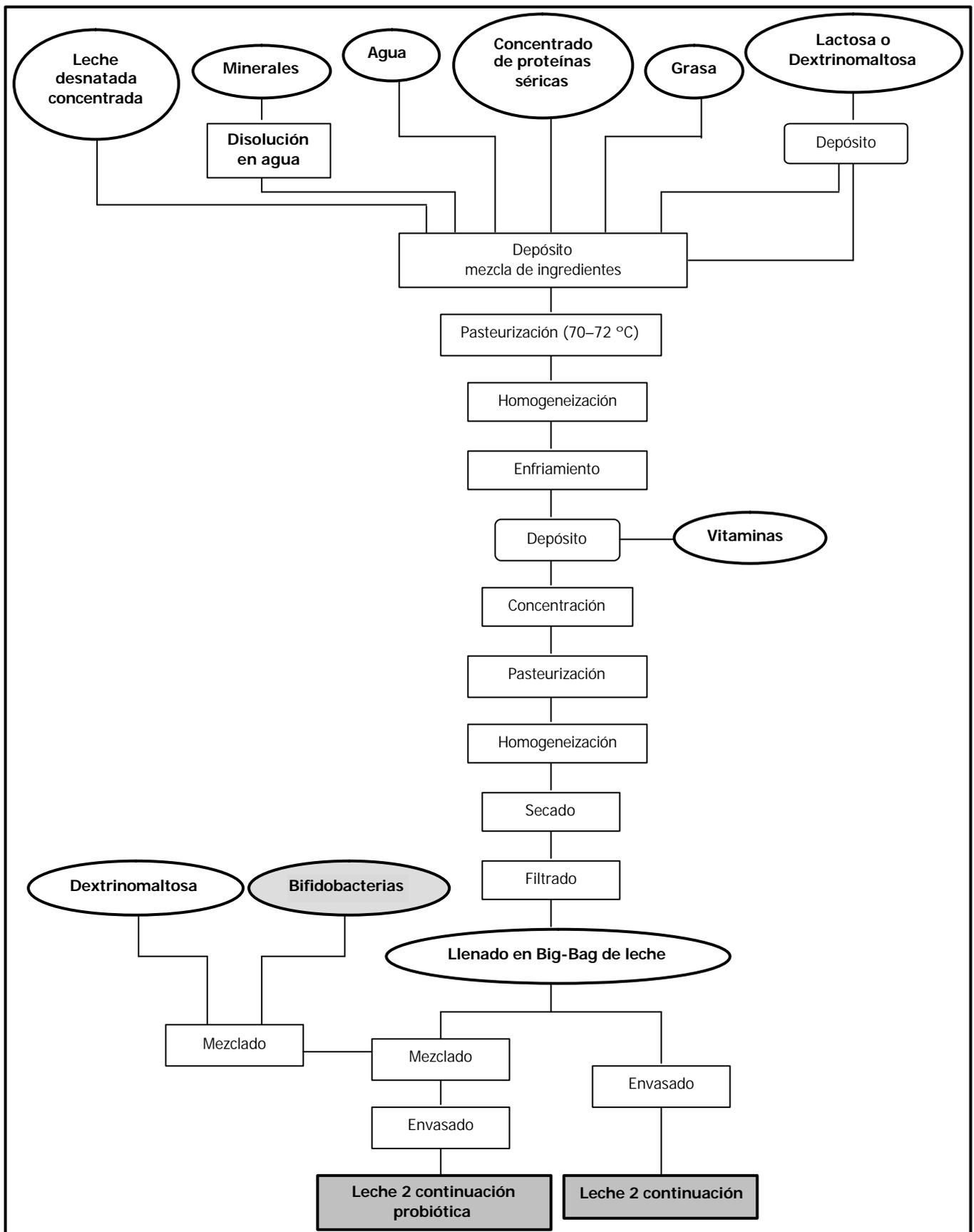


Figura 9. Diagrama de flujo de la elaboración de Leche 2 de continuación y Leche 2 de continuación probiótica

### 2.1.2. Dieta de mantenimiento para animales de laboratorio

Con el fin establecer un alimento de referencia con respecto a las fórmulas infantiles que se les administró a las ratas de laboratorio empleadas durante el estudio *in vivo* de los efectos de los probióticos, prebióticos y simbióticos ensayados, un grupo de ratas fue alimentado con una dieta de mantenimiento para ratas de laboratorio denominada A04.

### 2.2. Bifidobacterias

Las bifidobacterias empleadas en la evaluación *in vitro* de la utilización de los diferentes OND, así como de las entidades suministradoras aparecen recogidas en la siguiente Tabla:

**Tabla 15.** Bifidobacterias utilizadas para la evaluación de diferentes oligosacáridos

| Fuente de suministro                          | Especie de Bifidobacteria       |
|---|---------------------------------|
| Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)    |                                 |
| CECT 4549                                     | <i>Bifidobacterium bifidum</i>  |
| CECT 4839T                                    | <i>Bifidobacterium breve</i>    |
| CECT 4551T                                    | <i>Bifidobacterium infantis</i> |
| Morinaga Nutritional Foods (Deutschland GmbH) |                                 |
| BB536   | <i>Bifidobacterium longum</i>   |

### 2.3. Oligosacáridos no digeribles (OND)

En la Tabla 16 y Figura 10 se muestran los diferentes OND (composición y estructura química) utilizados como sustratos para el crecimiento *in vitro* de las bifidobacterias.

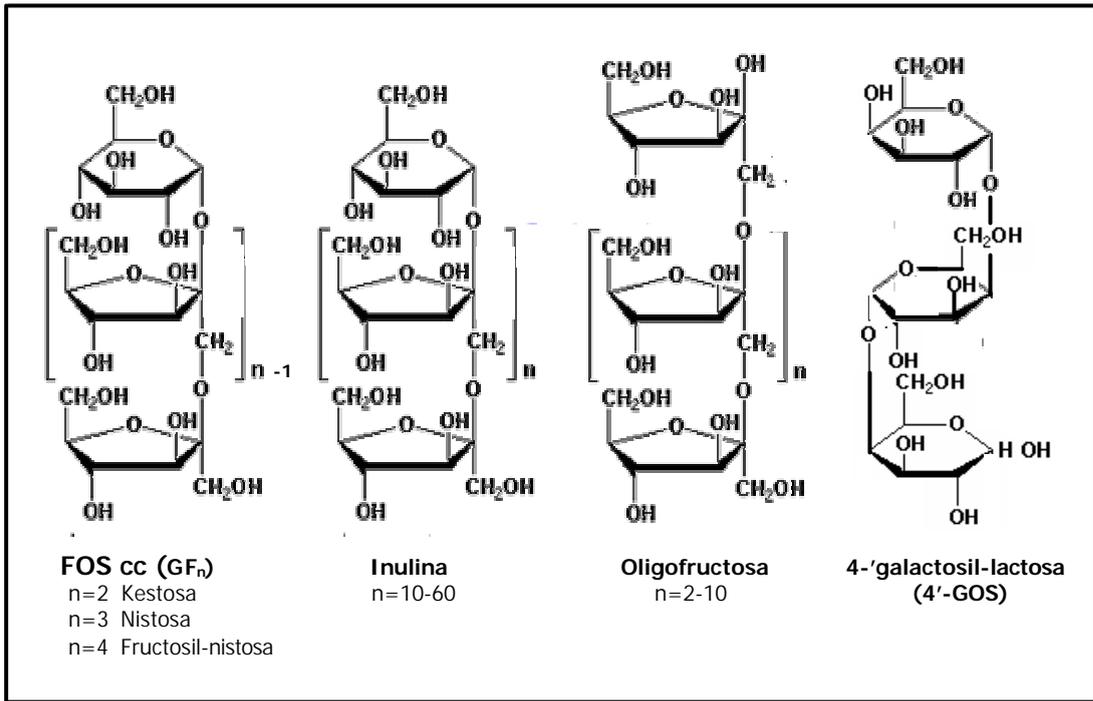
**Tabla 16.** Sustratos utilizados para el crecimiento de las bifidobacterias

| Substrato    | Producto        | Composición   |
|--------------|-----------------|---|
| Monosacárido | Glucosa         | D(+)glucosa   |
| FOS*         | Actilight 950P® | ‡GF <sub>2</sub> (30,38%), GF <sub>3</sub> (50,18%), GF <sub>4</sub> (15,69%), glucosa, fructosa y sacarosa |
|              | Raftiline HP®   | inulina (>99,5%), glucosa, fructosa y sacarosa  |
|              | Raftilose P95®  | oligofructosa (>93,2%), glucosa, fructosa y sacarosa  |
| GOS*         | Oligomate 55P®  | 4'-galactosil-lactosa (>55%), lactosa y monosacáridos (<45%)  |

\*FOS, fructooligosacáridos; GOS, galactooligosacáridos

‡GF<sub>2</sub>, kestosa; GF<sub>3</sub>, nistosa; GF<sub>4</sub>, fructosil-nistosa

Para simplificar la nomenclatura de los OS utilizados, puesto que el producto Actilight 950P® está compuesto por la mezcla de tres FOS (kestosa, nistosa y fructosil-nistosa), a partir de ahora nos referiremos a él como FOS de cadena corta (FOS cc). En el caso de los GOS, como el producto mayoritario es la 4'-galatosil-lactosa nos referiremos a él como 4'-GOS.



**Figura 10.** Estructura química de los componentes mayoritarios de los OND utilizados para el crecimiento selectivo de las bifidobacterias

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA

#### 1<sup>er</sup> ESTUDIO

##### 3.1. Evaluación *in vitro* del crecimiento de bifidobacterias y del cambio de pH del medio de cultivo, en presencia de diferentes oligosacáridos (OS)

###### Reactivos utilizados

- \* Caldo TPY (g/L):
  - 10,0 Triptona (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
  - 5,0 Peptona de soja (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 5,0 Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 2,5 Extracto de levadura (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
  - 1,0 Tween 80 (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 0,5 L-cisteína hidrocloreto (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>2</sub>S) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 2,0 di-Potasio hidrógenofosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 0,5 Cloruro de magnesio hexahidratado (Cl<sub>2</sub>Mg·6H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 0,5 Sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 0,15 Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  
- \* FOS de cadena corta (Actilight 950P<sup>®</sup>) (Beghin-Meiji Industries, Francia)
- \* GOS (Oligomate 55P<sup>®</sup>) (Yakult Pharmaceutical Industry Co., LTD., Japón)
- \* Inulina (Raftiline HP<sup>®</sup>) (Orafti, Bélgica)
- \* Oligofructosa (Raftilose P95<sup>®</sup>) (Orafti, Bélgica)
- \* Ácido sulfúrico 1% (v/v) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Cloruro de bario 1% (v/v) (BaCl<sub>2</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)

###### Material y equipo utilizados

- \* Agitador de tubos modelo REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, Alemania)
- \* Autoclave Sterilav-S 75 (Reypa, Barcelona, España)
- \* Bolsa generadora de gas (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>) Anaerogen AN 35 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Bomba de vacío (Barna-Vacío, Barcelona, España)
- \* Cubetas de poliestireno para espectrofotómetro (Kartell, Noviglio, Italy)
- \* Espectrofotómetro de absorción molecular modelo U-2000 (Hitachi, Tokio, Japón)
- \* Estufa Incubac 2000 (P-Selecta, Barcelona, España)

- \* Indicador anaeróbico BR 55 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Jarra de anaerobiosis HP 11 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Tubos de ensayo de cristal de 20 mL de capacidad (Pobel, Madrid, España)
- \* pH-metro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España)

#### Preparación de las soluciones

- Caldo TPY: se mezclaron todos los ingredientes y posteriormente se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C. Cuando el caldo TPY se empleo como medio de cultivo para las bifidobacterias durante siete días, tanto los OS como la glucosa se añadieron a la concentración de 12 g/L.

#### Procedimiento

Las bifidobacterias empleadas en el presente estudio (Tabla 15) fueron adquiridas liofilizadas y fueron almacenadas en refrigeración (5 °C) hasta el momento de su utilización. Para su revivificación cada cultivo se rehidrató en caldo TPY (Tryptone Phytone Yeast) (Scardovi, 1986) mediante dos transferencias sucesivas de 24 h (Gomez Zavaglia y col., 1998) a 37 °C bajo condiciones de anaerobiosis. Posteriormente el cultivo rehidratado se inoculó al 5% de nuevo en caldo TPY y se incubó en las mismas condiciones descritas anteriormente. El cultivo entonces se monitorizó visualmente cada 4 h tras 16 h de incubación (Dubey y Mistry, 1996), evaluando el grado de turbidez (densidad óptica, DO) del cultivo a una longitud de onda de 600 nm (Gomez Zavaglia y col., 1998; Perrin y col., 2001; Crittenden y col., 2001) en un espectrofotómetro de absorción molecular hasta obtener un valor de 2 en la escala MacFarland (Figura 11). Esta medida equivale a una absorbancia de 0,615 y se corresponde con un crecimiento de  $6 \times 10^8$  ufc/mL. Para la realización de la escala MacFarland, se calibraron 7 patrones de turbidez. Éstos consistieron en una serie de tubos que contenían BaCl<sub>2</sub> al 1% y cantidades crecientes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%, dando origen a un precipitado de BaSO<sub>4</sub> origen de la turbidez, tal y como se muestra en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Preparación e interpretación de la escala de MacFarland

| Escala MacFarland | BaCl <sub>2</sub> 1% | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% | ufc/mL x10 <sup>8</sup> | DO    |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------|
| 0,5               | 0,05*                | 9,95*                             | 1,5                     | 0,116 |
| 1                 | 0,1                  | 9,9                               | 3                       | 0,351 |
| 2                 | 0,2                  | 9,8                               | 6                       | 0,615 |
| 3                 | 0,3                  | 9,7                               | 9                       | 0,996 |
| 4                 | 0,4                  | 9,6                               | 12                      | 1,205 |
| 5                 | 0,5                  | 9,5                               | 15                      | 1,256 |
| 6                 | 0,6                  | 9,4                               | 18                      | 1,667 |

\* Volumen en mL

Para las cepas bacterianas se estableció una equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la concentración de bacterias (en ufc/mL) que genera una turbidez similar.

Una vez alcanzada dicha concentración ( $6 \times 10^8$  ufc/mL), se añadió un inóculo al 1% (v/v) de cada una de las bifidobacterias a 4 tubos con tapón de rosca que contenían caldo TPY, cada uno con un sustrato diferente (Tabla 19) a una concentración de 1,2% (p/v). Los tubos se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante siete días. Se tomó una muestra asepticamente en tiempo 0 y cada 24 h, y tras agitar la muestra en un vortex se transfirió a una cubeta con el fin de medir la turbidez (DO del cultivo) de la misma manera que anteriormente fue descrita, expresando el crecimiento bacteriano como log decimal de las ufc. Como blanco se empleó un tubo con caldo TPY sin inóculo para cada uno de los cuatro sustratos.

Así mismo, se tomó otra muestra para registrar la variación del pH del medio de cultivo, medido igualmente cada 24 h con un pH-metro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España). Como sustrato control frente a los cuatro OS se empleó la glucosa que contenía el caldo TPY, utilizándose únicamente como referencia y como comparación con el resto de hidratos de carbono, ya que su valor no nos interesa desde el punto de vista funcional, puesto que al contrario que los OS, la glucosa es absorbida en el intestino delgado y no llega como fuente de energía para las bacterias del colon.

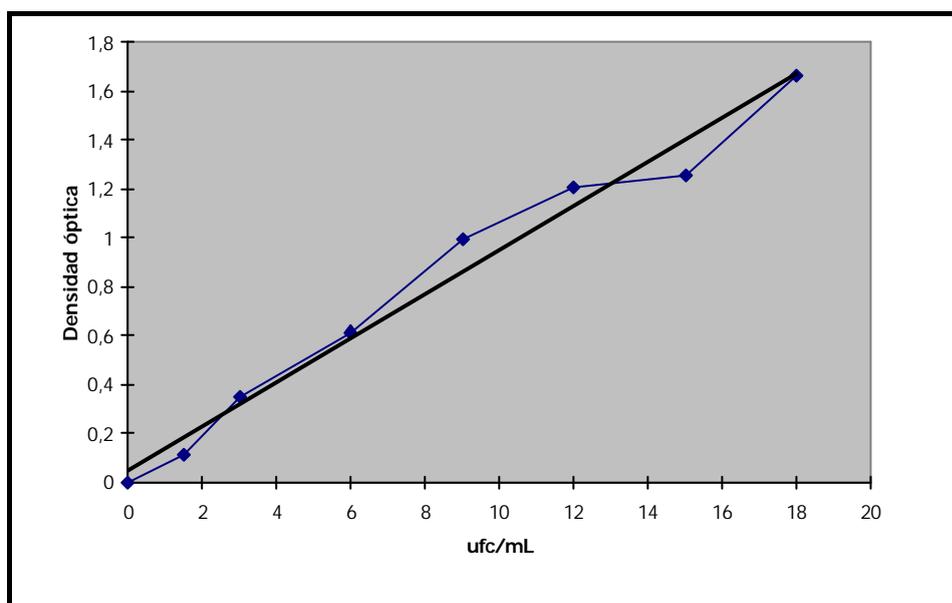


Figura 11. Representación de la recta de calibrado para la escala MacFarland

El contenido en microorganismos en los medios de cultivo se determinó a partir de la siguiente ecuación, obtenida de la recta patrón:

|                      |                         |                |
|----------------------|-------------------------|----------------|
| Concentración ufc/mL | — $y = 0,0901x + 0,049$ | $R^2 = 0,9785$ |
|----------------------|-------------------------|----------------|

## 2º ESTUDIO

### 3.2. Evaluación del grado de viabilidad de las bifidobacterias en las fórmulas infantiles

#### Reactivos utilizados

- \* Ácido nalidíxico ( $C_{12}H_{12}N_2O_3$ ) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Agar TPY (Scharlau, Barcelona, España)
- \* Agua de peptona tamponada (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Cloruro de litio (LiCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Fosfato disódico anhidro ( $Na_2HPO_4$ ) (Probus, Barcelona, España)
- \* Fosfato monosódico dihidrogeno anhidro ( $NaH_2PO_4$ ) (Probus, Barcelona, España)
- \* Sulfato de neomicina ( $C_{23}H_{46}N_6O_{13} \cdot 3H_2SO_4$ ) (734  $\mu$ g de neomicina por mg) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Tween 80 (Merck, Darmstadt, Alemania)

#### Preparación de soluciones

- Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0: se disolvieron 1,75 g de  $Na_2HPO_4$  y 10,52 g de  $NaH_2PO_4$  en 1 L de diluyente. Se ajustó el pH a 7,0.
- Solución antibiótica (NNL): se disolvieron 3 g/L de cloruro de litio, 0,1 g/L de sulfato de neomicina y 0,015 g/L ácido nalidíxico en agua destilada y añadieron en forma de solución esterilizada por filtración al medio de cultivo tras su esterilización en autoclave.
- Medio de cultivo TPY: Se suspendieron 51 g de polvo agar TPY en 1 L de agua destilada que contenía 1 mL de Tween 80. Posteriormente se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C y tras atemperar, se añadió estérilmente la solución antibiótica.

#### Material y equipo utilizados

- \* Agitador de tubos modelo REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, Alemania)
- \* Autoclave Sterilav-S 75 (Reypa, Barcelona, España)
- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Bolsa generadora de gas ( $CO_2 + H_2$ ) Anaerogen AN 35 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Bomba de vacío Tipo 019 de Barna-Vacío S.A. (Barcelona, España)
- \* Cabina de flujo laminar vertical (Telstar, Tarrasa, España)
- \* Contador de colonias digital (Bioser, Barcelona, España)

- \* Embudo con placa filtrante y esmerilado, vidrio borosilicato Pyrex de 35 mm de diámetro (Afora, Barcelona, España)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Estufa Incubac 2000 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Filtros de membrana estériles de nitrato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (Whatman, Maidstone, Kent, Inglaterra)
- \* Frascos Pyrex de 100 mL de capacidad (Afora, Barcelona, España)
- \* Indicador anaeróbico BR 55 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Jarra de anaerobiosis HP 11 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Matraz Kitasato de vidrio borosilicato Pyrex de 250 mL de capacidad Pyrex (Afora, Barcelona, España)
- \* Placas de petri (Sterilin, Inglaterra)
- \* Portafiltros SolVac de polipropileno de 47 mm de diámetro (Pall, Missouri, U.S.A.)

### Procedimiento

Se evaluó la viabilidad de las bifidobacterias añadidas a la fórmula infantil probiótica utilizando como control la fórmula infantil *Leche de continuación*, que se diferencia únicamente de la anterior en la ausencia de bifidobacterias en su composición. Con el fin de simular las condiciones de empleo de la fórmula infantil, el estudio se ha diseñado de acuerdo a la pauta de administración referida por el fabricante. Para ello teniendo en cuenta que para cada edad está indicada un número de tomas diarias, que cada medida son aproximadamente 4 g y que el envase tiene 900 g, se pueden diseñar cuatro estudios de duración diferente tal y como muestra la Tabla 18. De todos ellos fueron realizados los de seis y catorce días de duración, ya que abarcan los periodos de administración mínima y máxima. De la cantidad total de g de fórmula infantil que debía ser consumida por el niño diariamente, se tomaron 10 g para el análisis que fueron diluidos en 90 mL de tampón fosfato 0,1 M (Macfarlane y Englyst, 1986; Ingham, 1999) y mantenidos a 22 °C durante 30 min hasta la dispersión de la muestra. Posteriormente se tomó un volumen para realizar las diluciones decimales necesarias ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) con agua de peptona 0,1% (p/v), y se sembró 1 mL en masa sobre agar TPY +>NNL (Moreno y col., 2000) por duplicado. También fue tomada otra muestra de la solución madre (10 g de fórmula más 90 mL de agua de peptona) para medir el pH de la fórmula infantil durante los días de estudio. Las placas fueron incubadas a 37 °C en anaerobiosis durante 72 h. Así mismo, se determinó la humedad de las muestras, tal y como se indica en el punto 3.5.1. de la presente sección, nada más ser retiradas éstas del envase. Los análisis realizados tanto en la fórmula control como en la fórmula probiótica fueron realizados en tres botes para cada tipo de fórmula pertenecientes al mismo lote de producción.

**Tabla 18.** Diseño del estudio de la viabilidad de las bifidobacterias añadidas a las fórmulas infantiles en función de la pauta de administración indicada por el fabricante

| Edad del niño         | Pauta de administración                       | Duración |
|-----------------------|---|----------|
| 4º mes                | 4 g x 7 medidas x 5 tomas diarias = 140 g/día | 6 días   |
| 5º-6º mes             | 4 g x 8 medidas x 4 tomas diarias = 128 g/día | 7 días   |
| 7º-9º mes             | 4 g x 8 medidas x 3 tomas diarias = 96 g/día  | 9 días   |
| 10º-9º mes y 1-3 años | 4 g x 8 medidas x 2 tomas diarias = 64 g/día  | 14 días  |

Finalmente, se obtuvo el porcentaje de viabilidad de las bacterias estudiadas aplicando el siguiente cálculo (Shin y col., 2000a):

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{ufc } t_1}{\text{ufc } t_0} \times 100$$

donde  $t_0$  es el día comienzo del estudio, y  $t_1$  es el día de finalización del estudio.

### 3.3. Composición de la flora fecal de bebés alimentados con fórmula infantil probiótica

#### Reactivos utilizados

- \* Agar Bacteroides Bile Esculin (BBE) (g/L):
  - 40,0 Trypticase soy agar (BBL, Kansas city, U.S.A.)
  - 20,0 Bilis de bovino (Ox gall powder) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
  - 1,0 Esculina ( $C_{15}H_{16}O_9 \cdot 1,5H_2O$ ) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 0,5 Citrato de amonio y hierro (III) ( $NH_4Fe(C_6H_5O_7)$ ) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 2,0 mL/L Solución de Hemin (5 mg/mL) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 2,5 mL/L Solución de Gentamicina (40 mg/mL) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Agar Columbia sangre (CBA) (g/L):
  - 39,0 Agar Columbia (base) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - Sangre desfibrinada de oveja (Oxoid, Hampshire, Inglaterra).
- \* Agar Triptosa-Sulfito-Cicloserina (TSC) (g/L):
  - 42,0 Agar Triptosa-Sulfito-Cicloserina (base) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 3,0 mg/L Sulfato de polimixina ( $C_{55}H_{96} H_{16}O_{13} 2H_2SO_4$ ) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
  - 12,0 mg/L Sulfato de kanamicina ( $C_{18}H_{36}N_4O_{11} H_2SO_4$ ) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Agua de peptona tamponada + 0,5% glucosa (p/v) (APTG) (g/L):
  - 20,0 Agua de peptona tamponada (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 5,0 D(+)-Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Medio Rafinosa Bifidobacterium (RB) (g/L):

- 18,0 Agar bacteriológico No.1 (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 7,5 D(+) Rafinosa (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 5,0 Caseinato de sodio (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- 5,0 Extracto de levadura (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- 3,0 Cloruro de litio (LiCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 15,0 Tioglicolato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>S) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 0,5 L-Cisteína (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 15,0 mL/L Púrpura bromocresol 1% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- 40,0 mL/L Solución salina (g/L):
  - 0,2 Magnesio sulfato (MgSO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 0,2 Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 1,0 Fosfato de potasio monobásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 1,0 Fosfato de potasio dibásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 10,0 Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 2,0 Cloruro sódico (NaCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Solución de peptona fisiológica reducida (RPS) (g/L):
  - 8,5 Cloruro sódico (NaCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 1,0 Peptona bacteriológica neutralizada (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - 0,5 L-cisteína hidrocloreto (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>ClNO<sub>2</sub>S) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Tinción de Gram:
  - Solución Cristal violeta 1% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - Solución Safranina 0,5% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - Lugol (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - Alcohol 95%
- \* Galería api 50 CH (Biomerieux, Francia)
  - Parafina líquida fluida (Merck, Darmstadt, Alemania)
  - Medio api 50 CHL (ampollas de 10 mL) (g/L):
    - 10,0 Polipeptona
    - 5,0 Extracto de levadura
    - 0,2 Sulfato magnesio 7 H<sub>2</sub>O
    - 0,05 Sulfato manganeso 4 H<sub>2</sub>O
    - 1,0 mL Tween 80
    - 3,6 L-arginina cloruro monohidrato
    - 2,0 Citrato diamonio
    - 5,0 Acetato sódico 3 H<sub>2</sub>O
    - 2,0 Fosfato dipotásico
    - 0,17 Púrpura bromocresol

### Preparación de medios y soluciones

- BBE: se mezclaron todos los ingredientes y se ajustó a pH  $7,0 \pm 0,1$  posteriormente se esterilizó a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. La solución de hemin (5 mg/mL) se preparó con 0,5 g Hemin (bovino) y 10 mL NaOH 1 N en 90 mL de agua destilada, y se añadió junto al resto de ingredientes antes de ajustar el pH.
- CBA: se esterilizó a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min y después se dejó enfriar hasta  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para añadir un 5% de sangre desfibrinada previamente atemperada a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- APTG: fueron esterilizados a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.
- RB: se ajustó a pH  $6,7 \pm 0,1$  y después se esterilizó a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.
- RPS: se ajustó a pH  $6,7 \pm 0,1$  y después se esterilizó a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.
- TSC: después de esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min, se dejó enfriar a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se añadieron estérilmente los antibióticos.

### Material y equipo utilizados

- \* Agitador de tubos modelo REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, Alemania)
- \* Autoclave Sterilav-S 75 (Reypa, Barcelona, España)
- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Botella de gas ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2 + \text{N}_2$ )
- \* Cabina de anaerobiosis (Departamento de Microbiología alimentaria, Universidad de Wageningen, Holanda)
- \* Cabina de flujo laminar vertical (Telstar, Tarrasa, España)
- \* Contador de colonias digital (Bioser, Barcelona, España)
- \* Estufa Incubac 2000 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Filtros de membrana estériles de nitrato de celulosa de 30 mm de diámetro y  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  de poro (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania)
- \* Jarra de anaerobiosis HP 11 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Microscopio de contraste de fase (Olympus America Inc, Melville, U.S.A.)
- \* pHmetro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España)
- \* Placas de petri (Sterilin, Inglaterra)
- \* Recipientes de plástico estériles de 100 mL de capacidad (Deltalab, Moirans, Francia)

### Procedimiento

El presente estudio consistió en determinar si la composición de la microflora fecal infantil se veía afectada por el consumo de una fórmula infantil probiótica (con *Bifidobacterium* spp.) durante el primer año de vida. Para ello fueron tomadas muestras fecales a la edad de 1,

3, 5, 7, 9 y 12 meses a cinco bebés. Dos de ellos actuaron como control, ya que estuvieron alimentados con la Leche 2 de continuación, empleada como base para elaborar la fórmula infantil probiótica que se administró a los otros tres bebés. Las muestras fueron recogidas por los padres en recipientes estériles e inmediatamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Los bebés fueron los hijos/as de miembros del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia. Los padres fueron informados del estudio y firmaron la hoja de consentimiento informado conforme a la ley de protección de datos (*Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal*) tal y como se muestra a continuación:

## HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

### TITULO DEL ENSAYO CLÍNICO

“COMPOSICIÓN DE LA FLORA FECAL DE BEBÉS ALIMENTADOS CON FÓRMULA INFANTIL PROBIÓTICA”

Yo (nombre y apellidos) .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado sobre el estudio y he podido hacer preguntas sobre el mismo.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con (nombre del investigador) .....

Comprendo que podré ser informado si lo deseo de los análisis y medidas que se practiquen a mi hijo/a.

Comprendo que podré ser informado si lo deseo de los resultados de este estudio.

Comprendo que la participación es voluntaria y que puedo retirar a mi hijo/a del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones

Acepto que los datos registrados con ocasión de este estudio pueden ser objeto de un tratamiento informático. Solamente autorizo su consulta a las personas que colaboran en el estudio sujetas al secreto profesional o a los representantes de las autoridades sanitarias.

Expreso libremente mi conformidad a que mi hijo/a participe en el estudio.

**Fecha**

**Nombre de los padres y del participante (mayúsculas)**

**Firma de los padres del participante**

En la Tabla 19 se resume el perfil de alimentación de los bebés empleados en el presente estudio.

**Tabla 19.** Alimentación de los bebés participantes en el estudio de la flora fecal infantil durante el primer año de vida

| Tipo de fórmula     | 1 mes  | 3 meses | 5 meses        | 7 meses          | 9 meses          | 12 meses         |
|---------------------|--------|---------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| Control (bebé 1)    | LM     | F11     | F12+CI         | F12+CI+B         | F12+CI+B         | F12+CI+B         |
| Control (bebé 2)    | LM+F11 | F11+CI  | F12+CI         | F12+CI+B         | F12+CI+B         | F12+CI+B         |
| Probiótica (bebé 3) | LM+F11 | F11     | <b>FIP</b> +CI | <b>FIP</b> +CI+B | <b>FIP</b> +CI+B | <b>FIP</b> +CI+B |
| Probiótica (bebé 4) | LM+F11 | LM+F11  | <b>FIP</b>     | <b>FIP</b> +CI+B | <b>FIP</b> +CI+B | <b>FIP</b> +CI+B |
| Probiótica (bebé 5) | LM     | F11     | <b>FIP</b> +CI | <b>FIP</b> +CI+B | <b>FIP</b> +CI+B | <b>FIP</b> +CI+B |

LM (Leche Materna), F11/F12 (Fórmula Infantil 1 ó 2), FIP (Fórmula Infantil Probiótica 2), CI (Cereales Infantiles), B (Beikosts: fruta + vegetales + carne + pescado)

El pH fecal se determinó tras hacer una suspensión fecal al 10% en NaCl 0,15 M y el pH se midió con un pHmetro tras homogeneizar la suspensión en un vortex (Langhendries y col., 1995). Para el análisis de la composición de la flora fecal se tomaron aproximadamente 3 g de muestra fecal, que fue diluida en 25 mL de agua de peptona tamponada con 0,5% de glucosa (APTG), dejándose las muestras durante 2 h antes de realizar los análisis con el fin de recuperar el mayor número de microorganismos posible. Tras este tiempo se hicieron las diluciones seriadas necesarias con solución de peptona fisiológica reducida (RPS), tomando 1 mL de muestra y homogeneizándola con 9 mL de RPS. Una alícuota de 0,3 mL fue sembrada en las placas de petri con el fin de cultivar los microorganismos (ver condiciones en la Tabla 20). Todos los análisis se realizaron bajo estrictas condiciones de anaerobiosis usando una atmósfera compuesta por 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, y fueron incubadas en jarras anaeróbicas.

**Tabla 20.** Condiciones de cultivo de los microorganismos investigados de la flora fecal infantil

| Bacteria                  | Medio de cultivo * | Diluciones                          | Temp. y tiempo incubación | Referencias                |
|---------------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <b>Anaerobios totales</b> | CBA                | 10 <sup>-4</sup> a 10 <sup>-7</sup> | 37 °C/48 h                | Langhendries y col., 1995  |
| <b>Bacteroides</b>        | BBE                | 10 <sup>-4</sup> a 10 <sup>-6</sup> | 37 °C/48 h                | Summanen y col., 1993      |
| <b>Bifidobacterias</b>    | RB                 | 10 <sup>-4</sup> a 10 <sup>-6</sup> | 37 °C/72 h                | Hartemink y Rombouts, 1999 |
| <b>Clostridios</b>        | TSC                | 10 <sup>-2</sup> a 10 <sup>-4</sup> | 37 °C/48 h                | Neut y col., 1985b         |

\*Columbia blood agar (CBA), Bacteroides bile esculine agar (BBE), Raffinose Bifidobacterium medium (RB), Tryptose sulfite cycloserine (TSC)

Tras el tiempo de incubación descrito para cada bacteria, éstas fueron contadas y el resultado se expresó como log decimal de las ufc por g de muestra. En el caso de las bifidobacterias, se tomaron algunas colonias para ser aisladas en medio de cultivo rafinosa bifidobacterium (RB) agar durante 48 h en condiciones de anaerobiosis. Tras este tiempo las colonias fueron testadas para:

1. Tinción de Gram. Se realizó siguiendo el protocolo estándar de tinción de Gram con los reactivos anteriormente descritos.
2. Morfología de la colonia al microscopio. Visualización de la colonia previamente teñida con el objetivo x40 y x100 (objetivo de inmersión).
3. Patrón de fermentación de hidratos de carbono. Fue determinado con la galería enzimática api 50 CH.

Cada test api 50 CH consta de cincuenta pocillos que contienen una zona anaerobia (la porción en forma de tubo) para el estudio de fermentación, y una zona aerobia (la porción en forma de cúpula) para el estudio de oxidación o asimilación. El primer pocillo no contiene ningún sustrato y se usa como control negativo. El resto de pocillos contienen una cantidad

determinada de sustrato deshidratado, pertenecientes a la familia de hidratos de carbono y sus derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos).

Estos sustratos pueden ser metabolizados mediante diferentes rutas bioquímicas:

- Asimilación: se indica por el crecimiento del microorganismo en la cúpula cuando el sustrato es la única fuente de carbono presente.
- Oxidación: se muestra por un cambio de color en la cúpula, y es debido a la producción aerobia de ácido detectado por el indicador de pH incluido en el medio elegido.
- Fermentación: se muestra por un cambio de color en el tubo, y es debido a la producción anaerobia de ácido detectado por el indicador de pH incluido en el medio elegido.

Para evaluar la última de estas rutas (fermentación) se usó la galería api 50 CH. La composición de cada test se muestra en la Tabla 21.

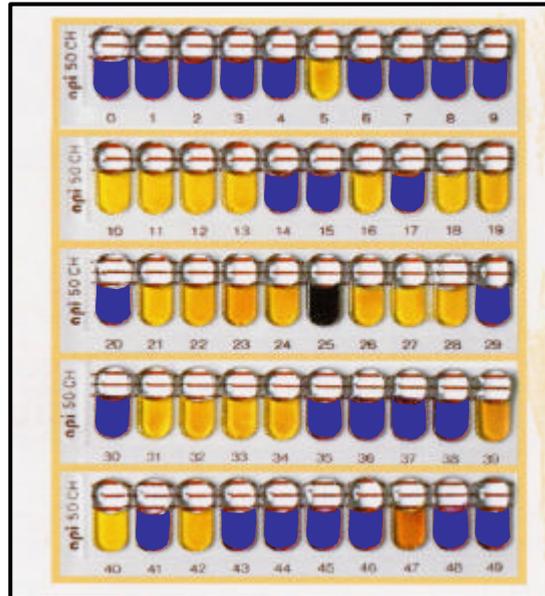
**Tabla 21.** Sustratos incluidos en cada uno de los 50 pocillos de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas api 50 CH

| Tira 0-9               |                  | Tira 10-19               |                  | Tira 20-29           |                  | Tira 30-39       |                  | Tira 40-49       |                  |
|------------------------|------------------|--------------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Pocillo/sustrato       | Pocillo/sustrato | Pocillo/sustrato         | Pocillo/sustrato | Pocillo/sustrato     | Pocillo/sustrato | Pocillo/sustrato | Pocillo/sustrato | Pocillo/sustrato | Pocillo/sustrato |
| 0. CONTROL*            | 10. GALactose    | 20. 1-Methyl-D-Mannoside | 30. MELibiose    | 40. D-TURanose       |                  |                  |                  |                  |                  |
| 1. GLYcerol            | 11. GLUcose      | 21. 1-Methyl-D-Glucoside | 31. Suucose      | 41. D-LYXose         |                  |                  |                  |                  |                  |
| 2. ERYthrol            | 12. FRUctose     | 22. N-Acetyl-Glucosamine | 32. TREhalose    | 42. D-TAGatose       |                  |                  |                  |                  |                  |
| 3. D-ARAbinose         | 13. MaNosE       | 23. AMYgdaline           | 33. INUlin       | 43. D-FUCose         |                  |                  |                  |                  |                  |
| 4. L-ARAbinose         | 14. SorBosE      | 24. ARButin              | 34. MeLeZitose   | 44. L-FUCose         |                  |                  |                  |                  |                  |
| 5. RIBose              | 15. RHAMnose     | 25. ESCulin              | 35. RAFFinose    | 45. D-ARAbitol       |                  |                  |                  |                  |                  |
| 6. D-XYLose            | 16. DULcitol     | 26. SALicin              | 36. Starch       | 46. L-ARAbitol       |                  |                  |                  |                  |                  |
| 7. L-XYLose            | 17. INOsitol     | 27. CELlobiose           | 37. GLYcoGen     | 47. GlucoNaTe        |                  |                  |                  |                  |                  |
| 8. ADOnitol            | 18. MANitol      | 28. MALtose              | 38. XyLiTol      | 48. 2-Keto-Gluconate |                  |                  |                  |                  |                  |
| 9. β-Methyl-D-Xyloside | 19. SORbitol     | 29. LACTose              | 39. GENTIobiose  | 49. 5-Keto-Gluconate |                  |                  |                  |                  |                  |

\* En la práctica, sólo se usan las abreviaturas en mayúsculas de los respectivos hidratos de carbono.

Para la realización del api test se tomó una colonia, tras haber sido aislada durante 48 h de incubación a 37 °C en anaerobiosis, y se inoculó en el medio api 50 CHL, pipeteándose entonces en los diferentes pocillos (en la parte del tubo). Posteriormente, se rellenaron las cúpulas con parafina fluida para mantener las condiciones anaerobias para la fermentación, y así se incubaron las tiras a 37 °C durante 48 h. Todo lo descrito anteriormente se realizó bajo condiciones anaerobias dentro de una campana de anaerobiosis.

Para la interpretación de los resultados los pocillos que aparecieron sin cambio de color (púrpura) se consideraron como “negativos” y aquellos dónde se detectó un cambio de color (amarillo, ó negro en el pocillo nº 25) (de acuerdo con el color del control) se consideró “positivo” (ver Figura 12).



**Figura 12.** Galería enzimática (metabolismo de hidratos de carbono) api 50 CH para bacterias ácido-lácticas

### 3<sup>er</sup> ESTUDIO

#### 3.4. Análisis nutricional de las dietas empleadas en el presente estudio

Para el presente estudio se utilizaron un total de nueve dietas, siendo la primera de ellas una dieta de mantenimiento (A04) para ratas de laboratorio, proporcionada por el animalario de la Universidad de Murcia. Las ocho dietas restantes fueron elaboradas a partir de las fórmulas infantiles Leche 2 de continuación y Leche 2 de continuación probiótica, cada una compuesta por la homogeneización de cuatro envases pertenecientes al mismo lote de producción. El primer estudio nos permitió la selección de dos especies de bifidobacterias: *B. bifidum* y *B. longum* (en base a su crecimiento y capacidad de reducir el pH del medio) y un sustrato: 4'-GOS (por su capacidad para estimular el crecimiento de las bifidobacterias). La Tabla 22 representa la combinación de estos probióticos (bifidobacterias) y prebióticos (4'-GOS, a concentraciones de 1,2, 5 y 10%) para elaborar las dietas empleadas en el estudio.

**Tabla 22.** Dietas empleadas en el estudio *in vivo* con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral

| Grupo | Dietas          | Composición dietas  |
|-------|-----------------|---|
| 1     | A04             | Dieta de mantenimiento A04                                |
| 2     | Control         | Leche 2 de continuación                                   |
| 3     | Probiótica      | Leche 2 de continuación + bifidobacterias                 |
| 4     | Prebiótica 1,2% | Leche 2 de continuación + 4'-GOS (1,2%)                   |
| 5     | Prebiótica 5%   | Leche 2 de continuación + 4'-GOS (5%)                     |
| 6     | Prebiótica 10%  | Leche 2 de continuación + 4'-GOS (10%)                    |
| 7     | Simbiótica 1,2% | Leche 2 de continuación + bifidobacterias + 4'-GOS (1,2%) |
| 8     | Simbiótica 5%   | Leche 2 de continuación + bifidobacterias + 4'-GOS (5%)   |
| 9     | Simbiótica 10%  | Leche 2 de continuación + bifidobacterias + 4'-GOS (10%)  |

##### 3.4.1. Determinación de la humedad

Para la determinación de la humedad en las fórmulas infantiles se utilizó el método 934.01 de la A.O.A.C. (1999).

##### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Placas de petri de vidrio (Pobel, Madrid, España)

### Procedimiento

Las muestras fueron desecadas durante 20 h a 110 °C, en una estufa de aire forzado, hasta obtener peso constante. La pérdida de peso se calculó en porcentaje del peso de la muestra. Para el cálculo de la humedad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

donde  $M_0$  es el peso (g) de la placa y de su tapadera,  $M_1$  es el peso (g) de la placa y de su tapadera y de la muestra fresca y  $M_2$  es el peso (g) de la placa y de su tapadera y de la muestra desecada.

### **3.4.2. Determinación de la proteína bruta**

**Para la determinación de la proteína bruta se ha seguido el procedimiento de *micro-Kjeldahl*, método 991.20 de la A.O.A.C. (1999).**

#### Reactivos utilizados

- \* Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Ácido sulfúrico puro ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Alcohol etílico ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ ) 96% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Azul de metileno ( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 2\text{-3H}_2\text{O}$ ) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Hidróxido sódico (NaOH) 38% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Rojo de metilo ( $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Selenio (Panreac, Barcelona, España)
- \* Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Sulfato potásico ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Verde de bromocresol ( $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ ) (Panreac, Barcelona, España)

#### Preparación de soluciones

- Mezcla catalítica: esta mezcla fue preparada con los siguientes reactivos: selenio, sulfato de cobre pentahidratado y sulfato potásico ( $\text{Se/CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O/K}_2\text{SO}_4$ ) en una proporción 1/1,25/14,42 (p/p/p), respectivamente.

- Solución de indicador mixto (4%): esta solución fue preparada disolviendo 2 g de rojo de metilo y 1 g de azul de metileno en 1 L de alcohol etílico 96%.

#### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Bureta de cristal (Pobel, Madrid, España)
- \* Matracas erlenmeyer de 250 mL de capacidad (Pobel, Madrid, España)
- \* Placa de agitación magnética modelo M-500 (Darlab Egara S.L., Tarrasa, España)
- \* Probeta graduada de plástico de 25 mL (Pobel, Madrid, España)
- \* Tubos de digestión Kjeldahl (Pobel, Madrid, España)
- \* Equipo de determinación de proteínas Kjeltex System y unidad de digestión (Tecator, Höganäs, Suecia)

#### Procedimiento

En un tubo de digestión se pesó 1 g de muestra a la cual se le adicionaron 7 g de mezcla catalítica y 15 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), llevando el tubo al bloque calefactor, donde permaneció aproximadamente 45 min a 400 °C. Una vez realizada la digestión, el tubo fue llevado a la unidad de destilación, neutralizando la muestra con hidróxido sódico (NaOH) al 40%. Los iones amonio formados en esta fase son arrastrados con la destilación y recogidos en una solución de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) al 4% con solución indicadora de rojo de metilo y verde de bromocresol. Este indicador permite identificar la variación del pH del medio debido a la concentración de iones amonio, en función del color rojo (medio ácido) o verde (medio básico). Finalmente se realizó la valoración con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N para determinar la cantidad de amoniaco absorbido por el  $H_3BO_3$ . Para el cálculo de la proteína bruta se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Proteínabruta(\%)} = \frac{(V_2 - V_1) \times N}{M} \times 1,4 \times 6,25$$

donde  $V_1$  es el volumen (mL) de la solución de HCl requerido para la prueba del blanco,  $V_2$  es el volumen (mL) de solución de HCl requerido para la muestra problema,  $N$  la normalidad de la solución de ácido clorhídrico y  $M$  el peso (g) de la muestra.

### 3.4.3. Determinación de la grasa bruta

El contenido en grasa bruta en las fórmulas infantiles se determinó mediante la técnica desarrollada por la Dirección General de Control y Análisis de la Calidad, Secretaría General para el Consumo del Ministerio de Sanidad y Consumo (1985). (Norma ISO-1443).

#### Reactivos utilizados

- \* Ácido clorhídrico (HCl) 37% (v/v) (Merck Darmstadt, Alemania)
- \* Éter dietílico (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O) p.a. exento de peróxidos (Merck, Darmstadt, Alemania)

#### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Embudos de cristal (Pobel, Madrid, España)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Matraces de fondo plano de 500 mL de capacidad (Pobel, Madrid, España)
- \* Papel de filtro de 20 cm de diámetro (Albet, Barcelona, España)
- \* Bloque calefactor (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Probeta graduada de cristal de 250 mL (Pobel, Madrid, España)
- \* Tiras de papel indicador de pH (Indesa, Barcelona, España)
- \* Extractor de grasas modelo 2055 Soxtec Avanti (Foss Tecator AB, Höganäs, Suecia)
- \* Vasos metálicos (Foss Tecator AB, Höganäs, Suecia)

#### Procedimiento

A 4 g de muestra se les añadieron 150 mL de HCl, sometiendo la muestra a ebullición suave durante 1 h y media. Se dejó enfriar y se filtró sobre doble papel de filtro, evitando cualquier paso de materia grasa al filtrado. El residuo resultante se lavó con agua caliente hasta la desaparición de la reacción ácida, comprobándose mediante la utilización de papel indicador de pH. El papel de filtro conteniendo el residuo se dejó desecar durante toda la noche a 37 °C. Una vez seco el conjunto, se introdujo en el extractor, donde se efectuó la extracción con éter dietílico calentado a 80 °C durante 5 h, tras lo cual la grasa de la muestra quedó depositada en el fondo del vaso. Tras recuperar el disolvente empleado en la extracción, el vaso conteniendo el residuo de grasa fue desecado en la estufa durante 1 h a 105 °C. Tras dejarlo enfriar en un desecador, se pesó cuando alcanzó la temperatura ambiente. El porcentaje de grasa bruta se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Grasa bruta(\%)} = \frac{(M_1 - M_2)}{M} \times 100$$

donde  $M_1$  es el peso del vaso con el extracto etéreo,  $M_2$  es el peso del vaso vacío y  $M$  el peso de la muestra.

#### 3.4.4. Determinación de las cenizas

Se realizó según el procedimiento 945.46 de la A.O.A.C. (1999).

##### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Crisoles de porcelana C-4 (KPM, Berlín, Alemania)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Horno mufla modelo L3/S (Naberthem, Bremen, Alemania)
- \* Placa calefactora (P-Selecta, Barcelona, España)

##### Procedimiento

En un crisol de porcelana se pesó 1 g de muestra, el cual fue colocado en el horno mufla durante 15 h a 525 °C hasta la obtención de cenizas completamente blancas, sin restos de materia orgánica. El porcentaje de cenizas es calculado mediante la expresión:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

donde  $M_0$  es el peso del crisol vacío,  $M_1$  es el peso del crisol con la muestra y  $M_2$  el peso del crisol con las cenizas.

#### 3.4.5. Determinación de la fibra dietética total (FDT)

La Fibra Dietética Total (FDT) fue determinada según el procedimiento enzimático-gravimétrico 985.29 de la A.O.A.C. (1999), descrito por Prosky y col. (1988).

### Reactivos utilizados

- \*  $\alpha$ -Amilasa termoestable A-3306 (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Aminoglucosidasa de *Aspergillus niger* A-9913. (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Celite 545 (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Etanol 78% y 95% (v/v) ( $C_2H_6O$ ) (Scharlau, Barcelona, España)
- \* Fosfato disódico anhidro ( $Na_2HPO_4$ ) (Probus, Barcelona, España)
- \* Fosfato monosódico dihidrogeno anhidro ( $NaH_2PO_4$ ) (Probus, Barcelona, España)
- \* Hidróxido sódico (NaOH) 40% (Panreac, Barcelona, España)
- \* Proteasa P-3910 (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

### Preparación de soluciones

- Solución de NaOH 0,171 M: se diluyeron 171 mL de NaOH 1 N con agua destilada hasta un volumen total de 1 L.
- Tampón fosfato 0,05 M, pH 6,0: se disolvieron 0,875 g de fosfato disódico anhidro ( $Na_2HPO_4$ ) y 5,26 g de fosfato monosódico dihidrogeno anhidro ( $NaH_2PO_4$ ) en 700 mL de agua, diluyendo hasta 1 L con agua destilada. Se ajustó el pH a 6,0.
- Solución de proteasa: diluir 40 mg de proteasa en 0,8 mL de tampón fosfato 0,05 M.
- Solución de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0,205 M: se diluyó con agua destilada 205 mL de una solución de  $H_3PO_4$  1,0 M hasta un volumen de 1 L.

### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Baño termostático Unitronic 320 OR con agitación (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Bomba de vacío Tipo 019 (Barna-Vacío, Barcelona, España)
- \* Crisoles de placa porosa borosilicato 3.3 de 30 mL (Tecator, Höganäs, Suecia)
- \* Equipo de determinación de proteínas Kjeltex System y unidad de digestión (Tecator, Höganäs, Suecia)
- \* Equipo para la determinación de fibra modelo Fibertec System E (Tecator, Höganäs, Suecia)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Horno mufla modelo L3/S (Naberthem, Bremen, Alemania)
- \* pH-metro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España)

## Procedimiento

Se pesó 1 g de muestra por duplicado y se le adicionaron 50 mL de tampón fosfato 0,05 M de pH 6, agitando hasta obtener una dispersión homogénea. Posteriormente se llevó la muestra a un baño a 95 °C y se le adicionó 0,2 mL de  $\alpha$ -amilasa termoestable, para gelatinizar el almidón, manteniéndola durante 30 min. Una vez completado el tiempo de digestión, las muestras se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente, ajustando el pH de la muestra a 7,5 con la solución de NaOH 0,171 M. Se transfirieron las muestras a un baño a 60 °C y se les adicionó 0,1 mL de la solución de proteasa para eliminar la proteína de la muestra, manteniéndolas durante 30 min en agitación continua. Tras la proteolisis se enfriaron nuevamente las muestras y se llevaron a pH 4,5 con la solución de  $H_2PO_4$  0,205 M, alcanzando así el pH óptimo para la digestión de la muestra con 0,3 mL de la enzima amiloglucosidasa a 60 °C durante 30 min. Sobre el volumen de digestión, se adicionaron 200 mL de etanol 95% a 60 °C para precipitar la fracción soluble de la FDT, dejando las muestras a temperatura ambiente durante un tiempo mínimo de 12 h. Posteriormente se filtraron utilizando crisoles de cristal con un tamaño de poro de 40-60  $\mu$ m, sobre los cuales previamente se pesaron 0,5 g de Celite, formando una fina capa con el fin de reducir el tamaño del poro de filtración. Durante la filtración se lavaron los vasos de digestión y los residuos con etanol 78%. Una vez obtenidos los residuos por duplicado para una muestra, se determinó sobre uno de ellos el contenido de cenizas (método 945.46 de la A.O.A.C., 1999) y sobre el otro el contenido de proteína bruta (método 991.20 de la A.O.A.C., 1999), calculando el porcentaje de FDT con la siguiente ecuación:

$$FDT (\%) = \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - (PB + C) - B}{\frac{M_1 + M_2}{2}} \times 100$$

donde  $R_1$  y  $R_2$  son el peso (mg) de los residuos del duplicado de la muestra,  $PB$  es el contenido (mg) de proteína bruta en uno de los residuos,  $C$  es el contenido (mg) de cenizas en el otro residuo,  $B$  el valor del blanco de los reactivos (mg), y  $M_1$  y  $M_2$  los pesos de los duplicados de la muestra (mg).

### **3.4.6. Determinación de los hidratos de carbono**

La determinación de hidratos de carbono se realizó por diferencia (FAO/OMS, 1982), a partir de los resultados obtenidos en las determinaciones de grasa (G), cenizas (C), proteína bruta (PB), humedad (H) y fibra dietética total (FDT) de forma que:

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = 100 - (\text{G} + \text{C} + \text{PB} + \text{H} + \text{FDT})$$

### 3.4.7. Valor energético

El valor energético de las muestras se obtuvo mediante la suma del valor energético de la proteína, de los hidratos de carbono y de la grasa de cada una de las muestras. Para ello se utilizaron los siguientes factores de conversión de acuerdo los números de Atwater (FAO/OMS/UNU, 1985):

- Proteínas: 4 Kcal/g
- Hidratos de carbono: 4 Kcal/g
- Grasas: 9 Kcal/g

### 3.4.8. Determinación de la composición mineral (Ca, Mg y Fe)

La determinación de minerales (Ca, Mg y Fe) se realizó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), siguiendo el método 985.35 de la A.O.A.C. (1999).

#### Reactivos utilizados

- \* Ácido clorhídrico calidad Suprapur (HCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Ácido nítrico calidad Suprapur (HNO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Agua bidestilada desionizada
- \* Cloruro de lantano con una pureza de 99,99% (LaCl<sub>3</sub>) (Fluka, Buchs, Suiza)
- \* Soluciones stock-patrón de 1.000 mg/L (Fluka, Buchs, Suiza):
  - **Calcio** (n° cat. 21049)
  - **Magnesio** (n° cat. 63046)
  - **Hierro** (n° cat. 44093)

#### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Crisoles de porcelana C-4 (KPM, Berlín, Alemania)
- \* Espectrofotómetro modelo 3100 (Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A.)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Horno mufla modelo L3/S (Naberthem, Bremen, Alemania)
- \* Matraces aforados de 50 y 100 mL de capacidad (Pobel, Madrid, España)
- \* Placa calefactora (P-Selecta, Barcelona, España)

### Limpieza del material de laboratorio

Todo el material de vidrio y porcelana utilizado en la determinación de minerales fue lavado durante una noche en ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 10% para arrastrar cualquier tipo de impureza adherida a las paredes del material, y posteriormente enjuagado tres veces con agua bidestilada desionizada.

### Procedimiento

Los minerales se determinaron a partir de las cenizas obtenidas tras la incineración de las muestras (heces, orina, contenido cecal (fase sólida y líquida) y huesos) a 525 °C durante 15 h. Estas cenizas fueron recogidas con 2 mL de  $\text{HNO}_3$  puro y 5 mL de HCl, agitando suavemente sobre una placa calefactora hasta su total evaporación. Posteriormente se añadió un volumen igual del mismo ácido, procediéndose a la evaporación de la mitad del mismo con el fin de disolver las cenizas en su totalidad. La solución obtenida fue llevada a un matraz aforado de 50 mL, al cual se le adicionaron los volúmenes de lavado del crisol, enrasando finalmente con agua bidestilada desionizada. Dependiendo del tipo de muestra y del mineral que se fuera a determinar, se realizó la correspondiente dilución (ver Tabla 24). Para evitar las interferencias con otros elementos (fosfatos), en la determinación de Ca y Mg se adicionó cloruro de lantano ( $\text{LaCl}_3$ ) al 0,1% (p/v) tanto a las muestras como a los patrones para estos dos elementos. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante del espectrofotómetro de absorción atómica (Ros, 1995; Martínez y col., 1998), especificándose las condiciones instrumentales en la Tabla 23.

**Tabla 23.** Condiciones instrumentales establecidas para la determinación de los minerales (Ca, Mg y Fe) investigados

| Elemento mineral | Longitud de onda (nm) | Apertura de rendija (nm) | Sensibilidad del chequeo (mg/L) |
|------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Ca               | 422,7                 | 0,7                      | 4,0                             |
| Mg               | 285,2                 | 0,7                      | 0,3                             |
| Fe               | 248,3                 | 0,2                      | 5,0                             |

La calibración se realizó utilizando distintas diluciones de patrones de los elementos minerales analizados a partir de las soluciones de patrones comerciales anteriormente señaladas. El cálculo de las concentraciones de cada uno de los minerales analizados, expresadas en mg/100 g de muestra, se realizó de diferente manera dependiendo del tipo de muestra empleada, tal y como se aprecia a continuación (Tabla 24).

**Tabla 24.** Cálculo de las concentraciones de los minerales (Ca, Mg y Fe) analizados en las diferentes muestras

| Dietas                                      |  |
|---|--|
| Ca y Mg                                     | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 250 y 500/ M*        |
| Fe  | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 5/ M                 |
| Heces                                       |  |
| Ca  | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 500, 1000 y 2000/ M  |
| Mg  | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 250 y 500/ M         |
| Fe  | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 50/ M                |
| Huesos                                      |  |
| Ca  | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 1000, 2000 y 2500/ M |
| Mg  | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 500 y 1000/ M        |
| Fe  | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 5/ M                 |
| Contenido ciego y colon (F.S.) <sup>f</sup> |  |
| Ca, Mg y Fe                                 | Elemento (mg/100 g) = [ppm] x 50/ 1000 x M         |
| Contenido ciego y colon (F.L.) <sup>f</sup> |  |
| Ca, Mg y Fe                                 | Elemento (mg/mL) = [ppm] x 25/ 1000                |
| Orina                                       |  |
| Ca  | Elemento (mg/100 mL) = [ppm] x 10 y 20             |
| Mg  | Elemento (mg/100 mL) = [ppm] x 20 y 200            |
| Fe  | Elemento (mg/100 mL) = [ppm] x 1/10                |

\* ppm es la concentración del mineral en partes por millón dada por el espectrofotómetro y M es el peso de la muestra utilizada en la determinación expresada en g

<sup>f</sup> F.S. es la fase sólida y F.L. es la fase líquida del contenido del ciego y del colon

La Tabla 25 muestra las concentraciones de los patrones utilizados para elaborar la recta de calibrado para cada uno de los elementos minerales estudiados y las ecuaciones de la recta pertenecientes a sus curvas de calibrado.

**Tabla 25.** Concentraciones de los patrones utilizados, ecuaciones de las rectas de calibrado y coeficientes de linealidad ( $R^2$ ) para las rectas patrón cada uno de los minerales determinados

| Mineral | Concentración (ppm) |     |     |     |     |   |   |   |   |   | Ecuación de la recta <sup>f</sup>               | $R^2$ |
|---------|---------------------|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|-------|
|         | 0,1                 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |   |       |
| Ca      |                     |     |     |     |     | * | * | * | * | * | $y = 2,67 \cdot 10^{-3} + 5,24 \cdot 10^{-2} x$ | 0,999 |
| Mg      | *                   | *   | *   | *   | *   |   |   |   |   |   | $y = 1,42 \cdot 10^{-3} + 0,65x$                | 1,000 |
| Fe      |                     |     |     |     |     | * | * | * | * | * | $y = 2,86 \cdot 10^{-3} + 4,76 \cdot 10^{-2} x$ | 0,998 |

\* Concentración (ppm) utilizada para elaborar la ecuación de la recta de cada elemento. En todos los casos se utilizaron 5 puntos.

<sup>f</sup> Definición de las variables dependiente e independiente de la ecuación de la recta. y = concentración del elemento; x = absorbancia.

### 3.4.9. Determinación de fósforo (P) total

La determinación de P se realizó mediante la técnica colorimétrica de amonio vanadato 986.24 de la A.O.A.C. (1999), descrita por Chapman y Pratt (1961).

#### Reactivos utilizados

- \* Ácido clorhídrico concentrado (HCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Ácido nítrico puro (HNO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Fosfato potásico monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (previamente desecado unas 2 h a 105 °C) (Probus, Barcelona, España)
- \* Metavanadato amónico (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) (Probus, Barcelona, España)
- \* Molibdato amónico tetrahidratado ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O) (Probus, Barcelona, España)

#### Preparación de soluciones

- Solución de molibdato amónico: 20 g de molibdato amónico tetrahidratado se diluyeron en 200 mL de agua destilada caliente (50 °C).
- Solución de metavanadato amónico: 1 g de metavanadato amónico se diluyó en 300 mL de agua destilada caliente, y tras enfriar se añadieron 140 mL de HNO<sub>3</sub>.
- Solución de metamolibdeno-vanadato: la solución de molibdato amónico se vertió lentamente y agitando sobre la solución de metavanadato amónico, enrasado a 1 L con agua destilada.
- Solución patrón de P para la recta de calibrado (Solución A): se pesaron 4,3885 g de potasio fosfato monobásico y se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Se añadieron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se diluyeron a 1 L. Esta solución contiene 1 mg/mL de P.
- Solución patrón de P para la recta de calibrado (Solución B): se diluyeron 10 mL de la solución A hasta 250 mL con agua destilada, obteniendo de este modo la solución B con una concentración de 0,04 mg/mL.

A partir de las soluciones A y B se prepararon las siguientes diluciones:

- a) A partir de la solución B se tomaron 5, 15 y 50 mL
- b) A partir de la solución A se tomaron 4, 6 y 8 mL

Las diferentes concentraciones de ambas soluciones fueron enrasadas a 50 mL en matraces aforados. De esta manera se obtuvieron las soluciones utilizadas para la recta patrón con unas concentraciones de P de 0,2, 0,6, 2, 4, 6 y 8 mg/50 mL.

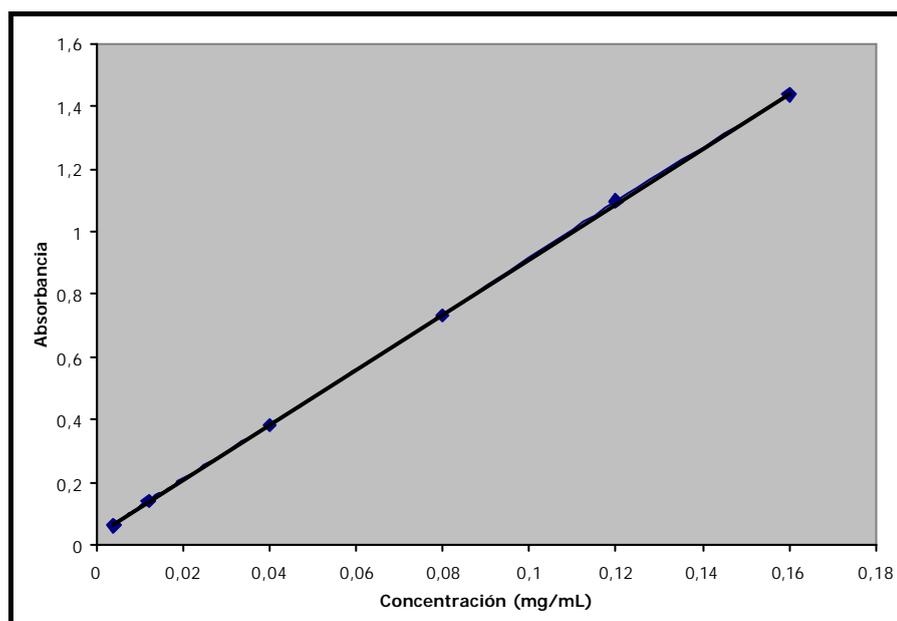
### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Crisoles de porcelana C-4 (KPM, Berlín, Alemania)
- \* Cubetas de poliestireno para espectrofotómetro (Kartell, Noviglio, Italy)
- \* Espectrofotómetro de absorción molecular modelo U-2000 (Hitachi, Tokio, Japón)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Horno mufla modelo L3/S (Naberthem, Bremen, Alemania)
- \* Matraces aforados de 50 mL de capacidad (Pobel, Madrid, España)
- \* Placa calefactora (P-Selecta, Barcelona, España)

### Procedimiento

Se pesó 1 g de muestra que fue incinerada a 525 °C durante 15 h hasta la obtención de cenizas. Posteriormente dichas cenizas fueron calentadas con 2 mL de  $\text{HNO}_3$  y 5 mL de HCl, en una placa calefactora durante 10 min, recogiendo la solución obtenida en un matraz aforado a 50 mL, adicionándole los volúmenes de lavado del crisol con agua destilada hasta completar un volumen total de 50 mL.

Para medir el contenido de P tanto en las soluciones patrón como en las muestras problema, se tomaron 5 mL de la solución final a los que se les adicionaron 10 mL del reactivo metamolibdeno-vanadato, enrasado finalmente a 50 mL con agua destilada. Las muestras fueron leídas a los 30 min en un espectrofotómetro de absorción molecular a 400 nm. A partir de los valores obtenidos de los patrones se realizó la siguiente recta patrón (Figura 13).



**Figura 13.** Representación de la recta de calibrado para el fósforo (P)

El contenido de fósforo de las soluciones problemas se determinó a partir de la siguiente ecuación, obtenida de la recta patrón:

|  |                |
|--|----------------|
| $\text{Concentración mg/mL} = \text{Abs} - 0,032 / 8,8051$ | $R^2 = 0,9999$ |
|--|----------------|

En el caso de las muestras de orina, se realizó un blanco del reactivo y de la muestra para evitar que el color amarillo de la orina interfiriera en la reacción colorimétrica entre los reactivos y el P de la muestra.

El contenido final de P en las muestras, expresado en mg/100 g, se determinó de diferente manera dependiendo del tipo de muestra empleada, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 26.** Cálculo de las concentraciones de fósforo (P) analizado en las diferentes muestras

| Muestras                                    |  |
|---|--|
| Dietas                                      | Fósforo (mg/100 g) = $[C \times 50 \text{ y } 500 / M] \times 100^*$     |
| Heces                                       | Fósforo (mg/100 g) = $[C \times 50 / M] \times 100$                      |
| Huesos                                      | Fósforo (mg/100 g) = $[C \times 2500 / M] \times 100$                    |
| Contenido ciego y colon (F.S.) <sup>φ</sup> | Fósforo (mg/100 g) = $[\text{ppm} \times 50 / M \times 1000] \times 100$ |
| Contenido ciego y colon (F.L.) <sup>φ</sup> | Fósforo (mg/100 mL) = $[\text{ppm} \times 250 / 1000] \times 100$        |
| Orina                                       | Fósforo (mg/100 mL) = $[C \times 500 \text{ y } 2500 / V] \times 100$    |

\* C es la concentración de fósforo expresada en mg/100 g, M es el peso de la muestra expresado en g, ppm es la concentración del mineral en partes por millón dada por el espectrofotómetro y V es el volumen de la muestra empleada en mL

φ F.S. es la fase sólida y F.L. es la fase líquida del contenido del ciego y del colon

### 3.5. Estudio *in vivo* con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral

#### 3.5.1. Animales

Las ratas de experimentación fueron suministradas por el animalario de la Universidad de Murcia (establecimiento autorizado para la producción y distribución de animales de laboratorio según Real Decreto 223/1988, sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos, publicada en el B.O.E. núm. 67 de 18 de marzo de 1988). Se utilizaron un total de cincuenta y cuatro ratas macho del tipo Sprague-Dawley recién destetadas (21 días de edad), con un peso corporal medio de 40-50 g. Los animales fueron instalados en jaulas colectivas (6 animales por cada jaula y grupo) para trasladarlas durante el periodo de balance mineral a jaulas metabólicas individuales de plástico (Techniplastgazzada, Bugugiatte, Italia), que permiten la recogida separada de heces y orina, así como el control de la ingestión de alimento y bebida. Fueron seleccionadas por peso para cada experimento,

recibiendo un tipo distinto de dieta. Los experimentos se realizaron en una cámara termorregulada a una temperatura  $23 \pm 2$  °C, con un fotoperíodo constante de 12 h de luz (desde las 8:00 a.m. hasta las 8:00 p.m.) y 12 h de oscuridad, y una humedad relativa de 50-70%.

### 3.5.2. Dietas

En la siguiente tabla se muestra el valor nutricional de las nueve dietas empleadas para la alimentación de las ratas.

**Tabla 27.** Composición nutricional de las dietas empleadas en el presente estudio de investigación

| Nutrientes              | Dietas       |   |
|-------------------------|--------------|---|
|                         | 1            | 2-9   |
| Energía (kcal/100 g)    | 317,68±0,01  | 465,80±4,38   |
| Humedad (%)             | 9,05±0,194   | 3,45±0,13   |
| Cenizas (%)             | 5,04±0,05    | 3,75±0,04   |
| Proteína (%)            | 14,00±0,05   | 13,85±0,13  |
| Grasa (%)               | 2,36± 0,06   | 22,20±0,21  |
| Hidratos de carbono (%) | 60,11±0,00   | 52,64±0,59  |
| Fibra (%)               | 18,49±1,81   | -   |
| Calcio (mg/100 g)       | 765,50±15,74 | 571,72±8,67   |
| Magnesio (mg/100 g)     | 150,09±0,66  | 50,10±0,86  |
| Fósforo (mg/100 g)      | 503,98±4,44  | 343,68±9,68   |
| Hierro (mg/100 g)       | 30,41±2,58   | 8,55±0,24   |
| Relación calcio/fósforo | 1,52         | 1,66  |
| Galactooligosacáridos   | NO           | { 2, 3...NO<br>4, 7...1,2%<br>5, 8...5%<br>6, 9...10% |
| Bifidobacterias         | NO           | { 2, 4, 5, 6...NO<br>3, 7, 8, 9...SI                  |

Las dietas empleadas cubren las necesidades de los minerales estudiados en el presente estudio para las ratas, que se establecen en 500 mg/100 g para el Ca, 3,5 mg/100 g para el Fe, 40 mg/100 g para el Mg y 400 mg/100 g para el P (NRC, 1978).

### 3.5.3. Pauta de recogida de datos y toma de muestras

#### 3.5.3.1. Ingestión de alimento, toma de peso en vivo, recogida de heces y orina

##### Reactivos utilizados

- \* Ácido clorhídrico (HCl) (Merck, Darmsttat, Alemania)
- \* Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (Merck, Darmsttat, Alemania)

### Material utilizado

- \* Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- \* Botellas de plástico de 250 mL de capacidad (Vidra Foc, España)
- \* Filtros con membrana de acetato de celulosa de 25 mm de diámetro y 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (Iwaki glass, Japón)
- \* Jaulas metabólicas de plástico (Techniplastgazzada, Bugugiatte, Italia)
- \* Jeringuillas de 10 mL (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.)
- \* Papel de filtro Whatman del n° 41, exento de cenizas (Maidstone, Kent, Inglaterra)
- \* Tubos de ensayo de cristal de 20 mL de capacidad (Pobel, Madrid, España)

### Procedimiento

El diseño experimental y la metodología de trabajo seguido en el estudio *in vivo* con ratas de laboratorio para determinar el efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral, se presenta en las Figuras 14 y 15. El estudio tuvo una duración de treinta días en total, de los cuales los cinco primeros se dedicaron a la adaptación de las ratas a la dieta. Los animales se pesaron al comienzo y al final de la experiencia, así como durante los tres periodos de tres días (días 8-10, 18-20 y 28-30) en que consistió el balance mineral, utilizando una balanza Sartorius. Antes del comienzo de la experiencia las jaulas, los recipientes de polietileno utilizados para la recogida de heces y orina, los comederos, bebederos, y los distintos botes para la recogida de muestras, se lavaron en  $\text{HNO}_3$  10% y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua bidestilada desionizada. Durante la experiencia, el alimento y agua bidestilada desionizada se proporcionaron *ad libitum*, midiendo la cantidad de alimento ingerido y de agua bebida en los tres periodos para cada uno de los animales. Durante los tres periodos también se procedió a la recogida de heces y orina con el fin de realizar el recuento de bifidobacterias (heces) y la determinación del contenido mineral (ambos). A los recipientes para la recogida de la orina se les añadió HCl 0,5 M a razón de 10 mL de ácido/L de orina (Lopez y col., 2000). La orina fue filtrada en primer lugar con papel Whatman n° 41 exento de cenizas para eliminar todo resto de comida, heces o cualquier otro material grosero, y posteriormente con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (Iwaki glass). La orina recogida de esta manera y las heces fueron almacenadas a 4 °C, para la determinación de minerales, ó a -20 °C en el caso de las heces destinadas al recuento microbiológico. Al final del periodo de balance, las ratas fueron anestesiadas y murieron por desangrado. Tras la apertura de la cavidad torácica se recolectó de cada rata toda la sangre posible de la arteria aorta. También fueron recogidas las siguientes piezas anatómicas: ciego y colon (incluyendo sus contenidos); fémur y tibia derecha.

### 3.5.3.2. Anestesia y disección

#### Reactivos utilizados

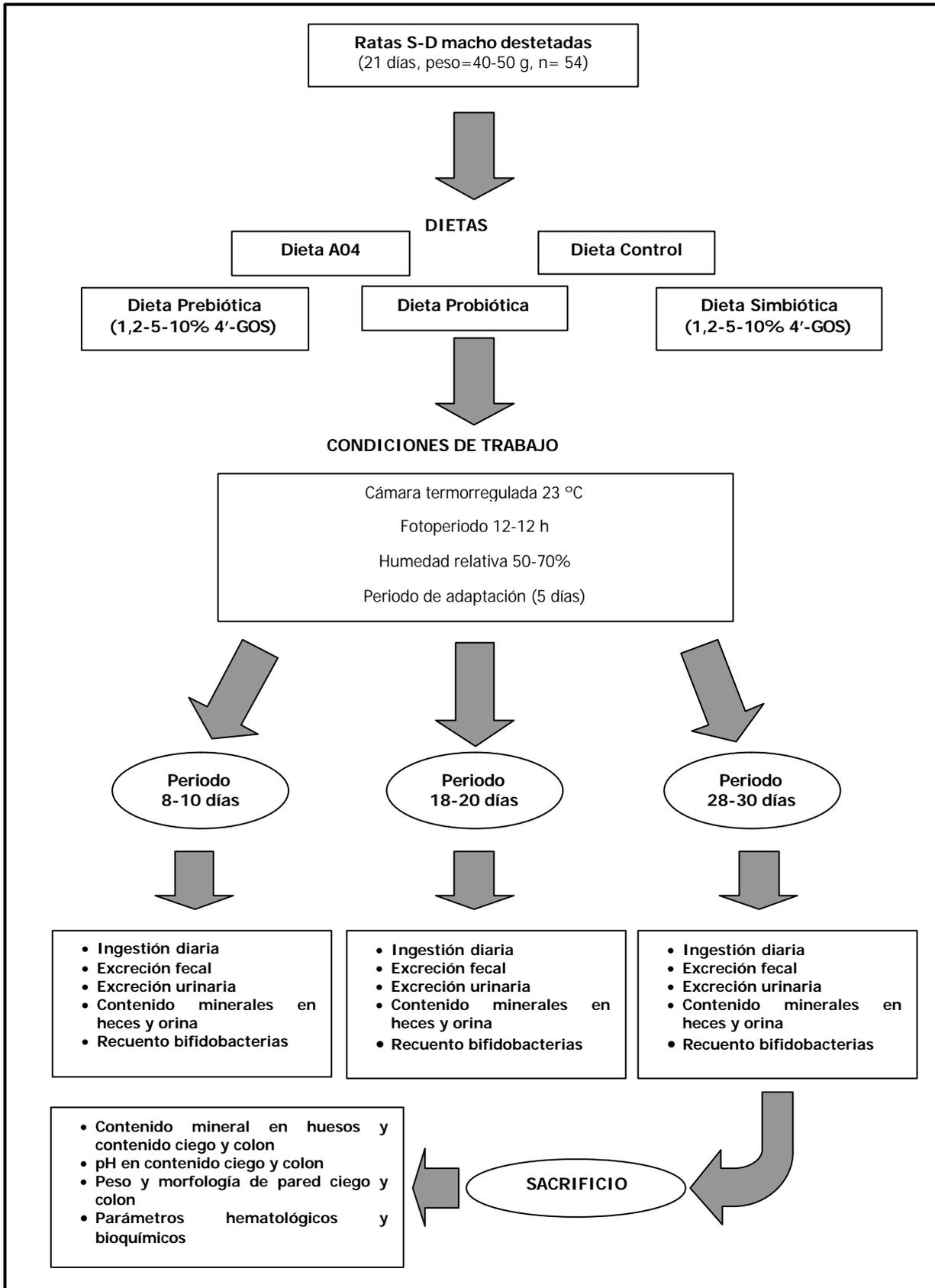
- \* Éter etílico ((CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O) (Probus, Barcelona, España)
- \* Solución salina fisiológica (9 g de NaCl/L)

#### Material utilizado

- \* Algodón hidrófilo.
- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- \* Bolsas de plástico de cierre hermético 80 x 120 mm (Vidra Foc, España)
- \* Campana de anestesia
- \* Guantes de latex (Ibertex, Barcelona, España)
- \* Hoja de bisturí nº 21 (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.)
- \* Jeringuillas de 5 mL (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.)
- \* Mangos de bisturí nº 3
- \* Pinzas de disección
- \* Tabla de disección
- \* Tijeras de disección
- \* Tubos de centrifuga de plástico

#### Procedimiento

Los animales fueron anestesiados con éter etílico, pesados e inmovilizados mediante la fijación de las extremidades y la cola en una tabla de disección. Se les practicó una disección a la altura de la línea media abdominal. Se separó la piel y posteriormente se abrió la cavidad abdominal permitiéndonos, al desplazar lateralmente las vísceras, un perfecto acceso a la aorta abdominal, de donde se extrajo la sangre (4-5 mL) y se procedió a la disección de los órganos seleccionados. Cada pieza anatómica seleccionada para el estudio fue diseccionada, evitando en la medida de lo posible el pedículo vascular y cualquier otro tejido no perteneciente a la pieza anatómica en sí.



**Figura 14.** Diseño experimental del estudio *in vivo* con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral

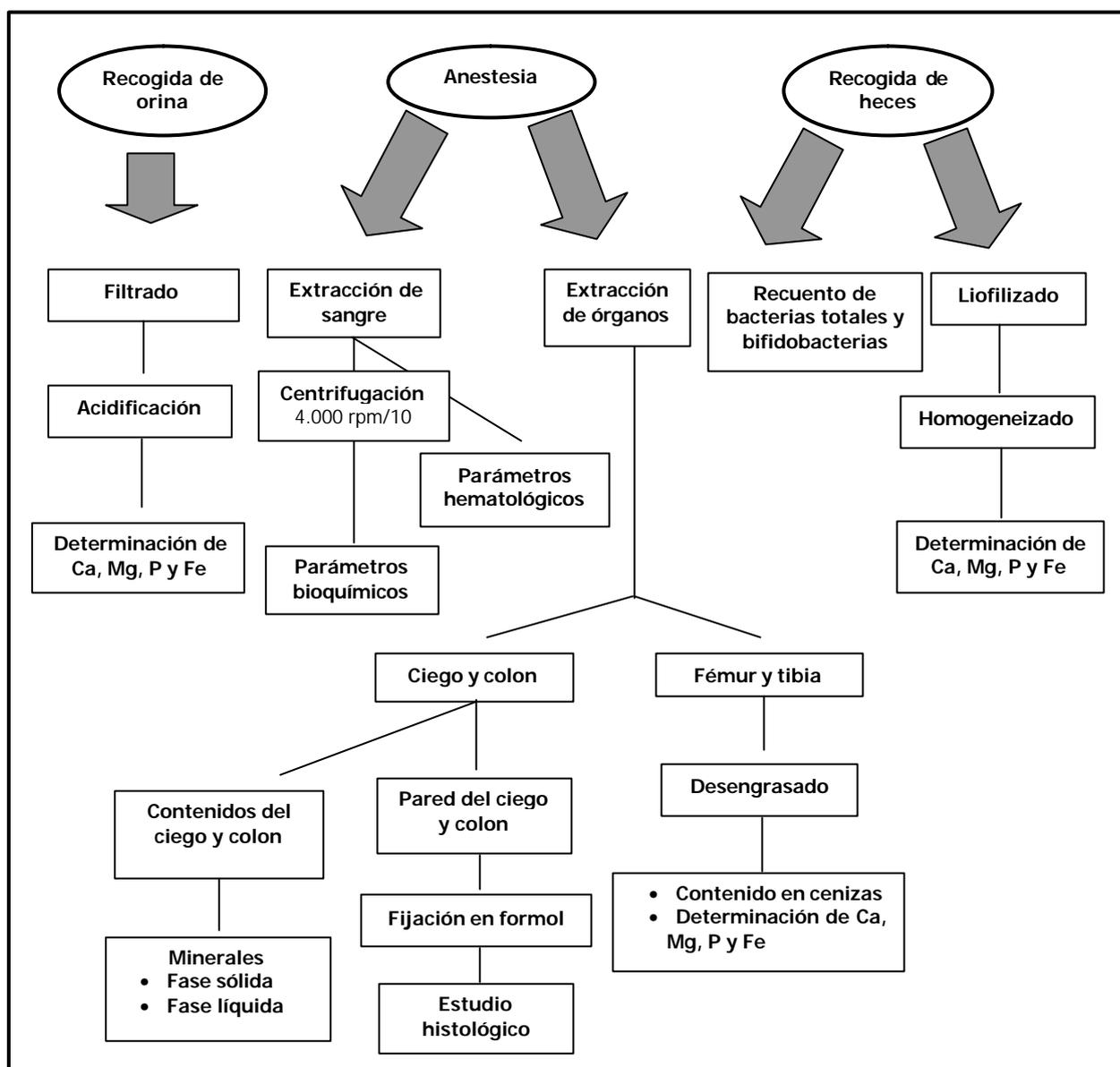


Figura 15. Metodología seguida en el estudio *in vivo* con ratas

### 3.5.4. Preparación de las muestras

#### Reactivos utilizados

- \* Éter de petróleo 40-60 ° (Probus, Barcelona, España)
- \* Formaldehído (CH<sub>2</sub>O) 36% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* *n*-Hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (Panreac, Barcelona, España)
- \* Solución salina fisiológica (9 g de NaCl/L)

### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- \* Bolsas de plástico de 80 x 120 mm (Vidra Foc, España)
- \* Centrifuga modelo 5416 (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Liofilizador modelo TD-3-MP (FTS Systems, New York, U.S.A.)
- \* Martillo de caucho
- \* pHmetro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España)

### Procedimiento

Para la preparación de las muestras se procedió con distintas metodologías dependiendo de la naturaleza y tipo de muestra. De forma general, todas las piezas anatómicas se lavaron cuidadosamente con SSF tras la extracción de las mismas. Después de extraer el ciego y del colon y previo a su limpieza, se procedió a la determinación del pH en el contenido de ambas vísceras mediante la inserción en la luz intestinal del electrodo de cristal del pHmetro. Posteriormente, el ciego y el colon se pesaron antes y después de vaciar sus contenidos, para proceder a su congelación (-20 °C) inmediatamente después de pesarlos hasta su análisis. La pared del ciego y del colon tras su limpieza con SSF y su pesada, se introdujeron en formol al 10% para su conservación hasta la realización del análisis histológico. El peso del contenido del ciego y del colon se evaluó como la diferencia entre el peso de los órganos con y sin el contenido.

Las piezas óseas fueron sometidas a un tratamiento, que consistió en el secado de los huesos en una estufa a 95 °C durante 24 h, seguido del desengrasado, manteniéndolos con *n*-hexano durante 12 h y otras 12 h en éter para completar la eliminación de la grasa, tras lo que se volvieron a secar en la estufa durante 5-6 h a 95 °C para medir el peso seco (Ros, 1995).

Las muestras de sangre fueron inmediatamente centrifugadas (12.000 x g durante 2 min) y el sobrenadante recogido se almacenó en refrigeración hasta el análisis de los lípidos sanguíneos.

Para la preparación de las muestras fecales, las heces se limpiaron de materia extraña adherida, se pesaron, fueron liofilizadas y molidas, tomándose una muestra de 0,5 g para el proceso de mineralización. El peso seco de las heces se estimó desecando una porción a 80 °C en una estufa hasta obtener peso constante.

Las muestras de orina por el contrario no requirieron una preparación especial, salvo la adición de ácido y el proceso de filtración descrito anteriormente (Punto 3.6.3.1.).

### 3.5.5. Determinación de parámetros hematológicos

#### Reactivos utilizados

- \* Anticoagulante de heparina (Analema, Vigo, España)

#### Material y equipo utilizados

- \* Contador celular Microcell counter modelo Sysmex F-800 (Toa Medical Electronics Co. LTD, Kobe, Japón)
- \* Tubos de vidrio de 5 mL (Vidra Foc, España)

#### Procedimiento

El análisis hematológico fue realizado inmediatamente después de la obtención de la muestra sanguínea para evitar cualquier tipo de alteración debida al paso del tiempo. De cada animal se obtuvieron de 4-5 mL de sangre en total, distribuyéndose en tubos de 0,5 a 1 mL para los distintos análisis. Tras la extracción de la sangre se determinó el recuento de glóbulos rojos (RGR), el valor hematocrito (HTC) y la hemoglobina (Hb), utilizando el contador celular Microcellcounter Sysmex F-800.

### 3.5.6. Determinación de parámetros bioquímicos

#### Material y equipo utilizados

- \* Autoanalizador de bioquímica tipo Cobas Mire Plus (Abx diagnostics, Montpellier, Francia)
- \* Centrifuga modelo 5416 (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- \* Pipetas Pasteur de vidrio (Vidra Foc, España)
- \* Tubos de plástico de cloruro de polivinilo (Vidra Foc, España)

#### Procedimiento

La valoración de estos parámetros se realizó durante las primeras 24 h de extracción sobre las muestras sangre centrifugadas a 4.000 x g durante 10 min.

- Hierro sérico y capacidad total de fijación de hierro (TIBC): El procedimiento a seguir en esta técnica se basa en la aplicación de dos equipos colorimétricos de bioMérieux, con

los que se consigue en primer lugar la saturación de la transferrina realizando posteriormente y de forma continua la determinación del Fe sérico y la TIBC. Para la determinación de TIBC utilizamos el kit comercial TIBC Additif de bioMérieux (Charbonnières-les-Bains Cedex, Francia). Este parámetro se valora después de la saturación de la transferrina sérica con una solución de Fe y la adsorción del exceso de Fe sobre hidroxicarbonato de Mg. Tras esta primera fase y después de centrifugar (3.000 rpm durante 15 min) se obtiene un sobrenadante al que le aplicaremos el equipo Ferrimat-kit de bioMérieux para la determinación de Fe sin desproteneización. Esta técnica se fundamenta en que en medio ácido y en presencia de guanidina se libera Fe férrico unido a las proteínas, principalmente del complejo Fe-transferrina. Por medio de la hidroxilamida se reduce el Fe férrico a ferroso que forma un complejo coloreado con la FerroZine (Hach Chemical Co., Ames, Iowa, USA). La reacción coloreada se mide en el espectrofotómetro de absorción molecular a una longitud de onda de 562 nm.

Para obtener nuestro valor numérico aplicamos las siguientes ecuaciones para el Fe sérico y la TIBC:

$$\text{TIBC (}\mu\text{g/100mL)} = \frac{A_m \text{ TIBC} - A_{bm} \text{ TIBC}}{A_p} \times n$$

donde  $A_m$  es la absorbancia de la muestra problema,  $A_{bm}$  la absorbancia del blanco de la muestra,  $A_p$  la absorbancia del patrón y  $n$  es un factor de conversión igual a 200.

$$\text{Hierro sérico (}\mu\text{g/100mL)} = \frac{A_m - A_{bm}}{A_p} \times n$$

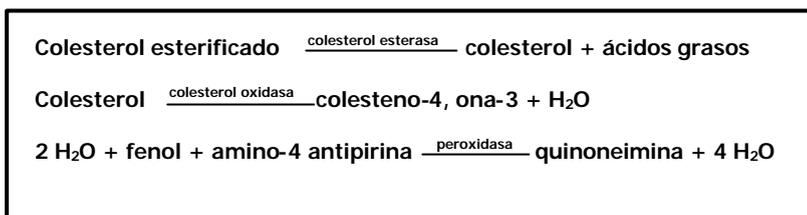
donde  $A_m$  es la absorbancia de la muestra problema,  $A_{bm}$  la absorbancia del blanco de la muestra,  $A_p$  la absorbancia del patrón y  $n$  es un factor de conversión igual a 600.

- **Albúmina:** Su determinación se llevó a cabo mediante el test colorimétrico "Bromocresol", mediante el cual la albúmina se combina con el verde de bromocresol a pH 4,2 produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado. La variación de color se midió a una longitud de onda de 630 nm.
- **Urea:** La medición de la urea fue realizada con el test cinético "Ureasa-GLDH". El fundamento del método consiste en la catalización de la hidrólisis de la urea presente en la muestra por la ureasa dando lugar a amonio y CO<sub>2</sub>. El amonio formado se valora mediante una reacción enzimática mediada por la glutamato deshidrogenasa (GLDH).

La disminución de la absorbancia, medida en un espectrofotómetro de absorción molecular a 340 nm, frente al tiempo es proporcional a la concentración de urea.

Los lípidos sanguíneos se determinaron a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro de absorción molecular. Los métodos que se emplearon fueron los recomendados por la Sociedad Española de Química Clínica:

- **Colesterol total:** Método enzimático colesterol esterasa-oxidasa-peroxidasa. Se empleó el kit comercial ABX Diagnostics Cholesterol 250 (Flegg, 1973). El COL se determina según el siguiente esquema de reacción:



- **HDL-Colesterol:** Se utilizó el kit comercial colesterol-hdl de Spinreact (William y col. 1979). Es un método enzimático-colorimétrico directo, que utiliza enzimas modificadas que en presencia de un detergente polianiónico reducen la actividad del COL especialmente en quilomicrones y VLDL.
- **LDL-Colesterol:** Se calculó por la fórmula de Friedewald y col. (1972):

$$\text{LDLcolesterol} = \frac{\text{Colesterol total} - \text{HDLcolesterol} - \text{Triglicéridos}}{5}$$

- **Triglicéridos:** Se empleó el kit comercial ABX Diagnostics Triglycerides 25 (Fossati y Prencipe, 1982). Es un método enzimático mediante el cual los TG son hidrolizados por una lipoproteína-quinasa a glicerol y AG. El glicerol es fosforilado por la glicerolquinasa en presencia de ATP formándose Glicerol-3-P, el cual es oxidado por una oxidasa liberándose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que por acción de una peroxidasa da lugar a un compuesto coloreado estable.

### 3.5.7. Recuento de bacterias totales y bifidobacterias fecales de las ratas

#### Reactivos utilizados

- \* Ácido nalidíxico (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Agar Clostridium reforzado (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)

- \* Agar Plate Count (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Agar TPY (Scharlau, Barcelona, España)
- \* Agua de peptona tamponada (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Cloruro de litio (LiCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Fosfato disódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Probus, Barcelona, España)
- \* Fosfato monosódico dihidrogeno anhidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Probus, Barcelona, España)
- \* Sulfato de neomicina (734  $\mu\text{g}$  de neomicina por mg) (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- \* Tween 80 (Merck, Darmstadt, Alemania)

#### Preparación de soluciones

- Las soluciones fueron preparadas de la misma forma que como se muestra en el punto 3.4. de esta sección.

#### Material y equipo utilizados

- \* Agitador de tubos modelo REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, Alemania)
- \* Autoclave Sterilav-S 75 (Reypa, Barcelona, España)
- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Bolsa generadora de gas ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ ) Anaerogen AN 35 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Bomba de vacío Tipo 019 de Barna-Vacío S.A. (Barcelona, España)
- \* Cabina de flujo laminar vertical (Telstar, Tarrasa, España)
- \* Contador de colonias digital (Bioser, Barcelona, España)
- \* Embudo con placa filtrante y esmerilado, vidrio borosilicato Pyrex de 35 mm de diámetro (Afora, Barcelona, España)
- \* Estufa Incubac 2000 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Filtros de membrana estériles de nitrato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (Whatman, Maidstone, Kent, Inglaterra)
- \* Frascos Pyrex de 100 mL de capacidad (Afora, Barcelona, España)
- \* Incubador de  $\text{CO}_2$  CB 150 WTB (Binder, Tuttlingen, Alemania)
- \* Indicador anaeróbico BR 55 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- \* Matraz Kitasato de vidrio borosilicato Pyrex de 250 mL de capacidad (Afora, Barcelona, España)
- \* Placas de petri (Sterilin, Inglaterra)

## Procedimiento

Todas las determinaciones bacterianas se realizaron inmediatamente tras la recogida de las muestras fecales. Se pesó aproximadamente 1 g de heces frescas y fueron diluidas en 9 mL de tampón fosfato (Macfarlane y Englyst, 1986; Ingham, 1999) y mantenidas a 22 °C durante 30 min hasta la dispersión de la muestra. Tras realizar las diluciones decimales ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) necesarias con agua de peptona 0,1% (p/v), se sembró en masa 1 mL del homogeneizado fecal sobre los medios de cultivo por duplicado como muestra la Tabla 28. Tras sembrar las placas éstas se incubaron a 37 °C en aerobiosis o anaerobiosis según correspondiera, durante 24-48 h para los mesófilos y 72 h para las bifidobacterias. Los resultados se expresaron como log ufc/g de heces.

**Tabla 28.** Medios de cultivo empleados en el recuento de las bifidobacterias y de flora total aerobia y anaerobia fecal en ratas

| Microorganismos              | Medio de cultivo                  | Referencias                   |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Mesófilos aerobios totales   | Plate Count Agar (PCA)            | Alles y col., 1999            |
| Mesófilos anaerobios totales | Reinforced Clostridial Agar (RCA) | Venketeshwer Rao y col., 1994 |
| Bifidobacterias              | TPY Agar + NNL                    | Moreno y col., 2000           |

### **3.5.8. Determinación del contenido mineral**

Tras la desecación y obtención del peso seco de las heces, piezas óseas (fémur y tibia) y fase sólida de los contenidos del ciego y del colon, éstas fueron incineradas en la mufla a 550 °C durante 12 h. Para facilitar la incineración, se añadieron 2 mL de HNO<sub>3</sub> a cada una de las muestras, se calentaron en una placa hasta la total evaporación del ácido, volviendo a incinerar a 550 °C durante unas 5 h adicionales, siguiendo un proceso similar al realizado por Sherman y col. (1985). Una vez realizada la incineración de las muestras se procedió a la determinación del contenido de Ca, Fe y Mg por EAA y de P por espectrofotometría de absorción molecular tal y como se describe en los apartados 2.5.8. y 2.5.9. de esta sección, respectivamente.

Las muestras líquidas, correspondientes a la orina y la fase líquida de los contenidos del ciego y colon, empleadas en la determinación mineral mediante EAA no sufrieron ningún tratamiento especial salvo el ya indicado en el punto 3.6.4. Para la determinación de P, se empleó la cantidad de 1 mL de muestra a la que se le adicionó 10 mL del reactivo molibdeno-vanadato y se enrasó a 50 mL con agua destilada.

### 3.5.9. Determinación del contenido mineral en la fase líquida y sólida de los contenidos del ciego y del colon

#### Reactivos utilizados

- \* Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 70% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Ácido tricloroacético (C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Cloruro de lantano con una pureza de 99,99% (LaCl<sub>3</sub>) (Fluka, Buchs, Suiza)

#### Material y equipo utilizados

- \* Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- \* Centrifuga modelo 5416 (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- \* Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Horno mufla modelo L3/S (Naberthem, Bremen, Alemania)
- \* Liofilizador modelo TD-3-MP (FTS Systems, New York, U.S.A.)
- \* Placa calefactora (P-Selecta, Barcelona, España)

#### Procedimiento

Tras descongelar las muestras de los contenidos del ciego y colon se tomó una parte de los mismos y se diluyó en cinco partes de agua bidestilada, y a continuación se centrifugaron a 40.000 x g durante 15 min. El sobrenadante y el precipitado fueron separados y pesados. El precipitado fue desecado, pesado e incinerado a 500 °C durante 12 h en horno mufla, disolviéndose las cenizas en 1 mL de HCl 6 M y 4 mL de agua bidestilada para su atomización. En el caso de Ca y Mg se analizaron en presencia de LaCl<sub>3</sub> al 0,1% (Schulz y col., 1993; Baba y col., 1996).

La distribución de los minerales entre la fase sólida y líquida del contenido cecal se calculó de la siguiente manera. El precipitado que se obtiene tras la centrifugación de los contenidos del ciego y colon es la fase sólida, pero ésta se encuentra parcialmente contaminada con sobrenadante (fase líquida). Así, el peso real de la fase sólida se obtuvo tras la desecación del precipitado en una estufa tal y como se indica en el punto 3.5.1. de esta sección. El peso real de la fase líquida se obtuvo como la suma del peso de la fase líquida que contaminaba el precipitado (peso total del precipitado menos el peso real de la fase sólida) más el peso del sobrenadante. La concentración de minerales en la fase sólida se calculó como la obtenida en el precipitado total menos la de la fase líquida que contaminaba el precipitado. Mientras que multiplicando la concentración mineral en el sobrenadante por el peso real de la fase líquida dio la cantidad de minerales de la fase líquida (Schulz y col., 1993).

### 3.5.10. Análisis histológico del epitelio de la pared del ciego y del colon

#### Reactivos utilizados

- \* Clara de huevo
- \* Eosina G (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Etanol absoluto (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Formaldehído (CH<sub>2</sub>O) 36% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Glicerina 30% (v/v) (Probus, Barcelona, España)
- \* Hematoxilina (Merck, Darmstadt, Alemania)
- \* Parafina 56-58 °C Histo grade (J.T. Baker, Holanda)
- \* Pegamento Histomount (Shandon, Pittsburgh, U.S.A.)
- \* Timol (Probus, Barcelona, España)
- \* Xileno (Shandon, Pittsburgh, U.S.A.)
- \* Xilol (Shandon, Pittsburgh, U.S.A.)

#### Preparación de reactivos

- Albúmina de Mayer: se puso la clara de huevo en agitación a las revoluciones necesarias para que se homogeneizara sin que llegase a punto de nieve. Luego se le añadió la misma cantidad de glicerina 30% y se homogeneizó. A esta solución se le añadió un poco de Timol, se agitó y filtró.

#### Material y equipo utilizados

- \* Baño histológico (Leica, Bensheim, Alemania)
- \* Cabina de extracción de gases
- \* Cámara modelo DXC-151 AP (Sony, U.S.A.)
- \* Cassettes de plástico (Simport, Canada)
- \* Cubreobjetos 24 x 24 mm (Menzel-Glaser, Alemania)
- \* Cuchillas desechables modelo 818 del microtomo (Leica, Bensheim, Alemania)
- \* Dispensador de parafina modelo EG 1160 (Leica, Bensheim, Alemania)
- \* Estufa Incubac 2000 (P-Selecta, Barcelona, España)
- \* Lápiz de grafito
- \* Microscopio óptico Axioskop (Zeiss, Alemania)
- \* Microtomo modelo RM 2155 (Leica, Bensheim, Alemania)
- \* Pinzas de diente de ratón de 10 cm (Vidra Foc, España)
- \* Portaobjetos 76 x 26 mm (Menzel-Glaser, Alemania)

- \* Procesador de tejidos modelo TP 1050 (Leica, Bensheim, Alemania)
- \* Programa de ordenador Microm Image Processing (MIP 4 Advanced) (Digital image systems, Barcelona, España)
- \* Tabla de madera

## Procedimiento

### Elaboración de las preparaciones histológicas

Tras la extracción de las muestras de la pared del ciego y del colon, éstas fueron limpiadas, secadas y pesadas. A continuación fueron fijadas en una solución de formol al 10%, con el fin de conservar las muestras en un estado lo más parecido al estado vivo, hasta su análisis. Para ello se siguió el proceso que a continuación se detalla:

- \* *Tallado de la muestra y formación de cassettes para la impregnación en parafina.* Se confeccionaron piezas de dimensiones finas (5 a 7 mm) de las siguientes partes: una muestra del ciego que correspondía al ápice del ciego y dos muestras del colon correspondientes a las zonas proximal (1 cm distal a la unión cecocólica) y distal (1 cm proximal al recto) (Howard y col., 1995a). Posteriormente se colocaron en el interior de los cassettes con las pinzas, almacenándose en formol hasta su procesado.
- \* *Proceso para la impregnación de las piezas en parafina.* De esta manera se consigue que los tejidos adquieran una consistencia tal que permita la posterior obtención de cortes delgadísimo mediante el microtomo. Este proceso se realizó en un procesador de tejidos cerrado (Leica modelo TP 1050) durante 18 h, mediante los siguientes pasos: deshidratación (por medio de una cadena de alcoholes de concentración creciente: 50% < 70% < 96% < absoluto), aclaramiento (mediante xilol) e impregnación con parafina a 59 °C.
- \* *Inclusión de las muestras en parafina y formación de bloques.* El objeto de la formación de bloques de parafina que incluyan las muestras a estudiar, es proporcionar a los tejidos un medio homogéneo no sólo dentro de la pieza sino también a su alrededor. Los bloques fueron confeccionados en un dispensador de parafina (Leica modelo EG 1160) y guardados en el congelador hasta que se cortaron en el microtomo.
- \* *Preparación de portaobjetos.* Los portas se limpiaron con alcohol absoluto para eliminar la posible presencia de grasa y polvo en el mismo. Una vez limpios y secos se les añadió una gota de solución fijadora (albúmina de Mayer) que se extendió por toda la superficie. Posteriormente los portas se secaron colocándolos sobre el borde de un baño de agua caliente.

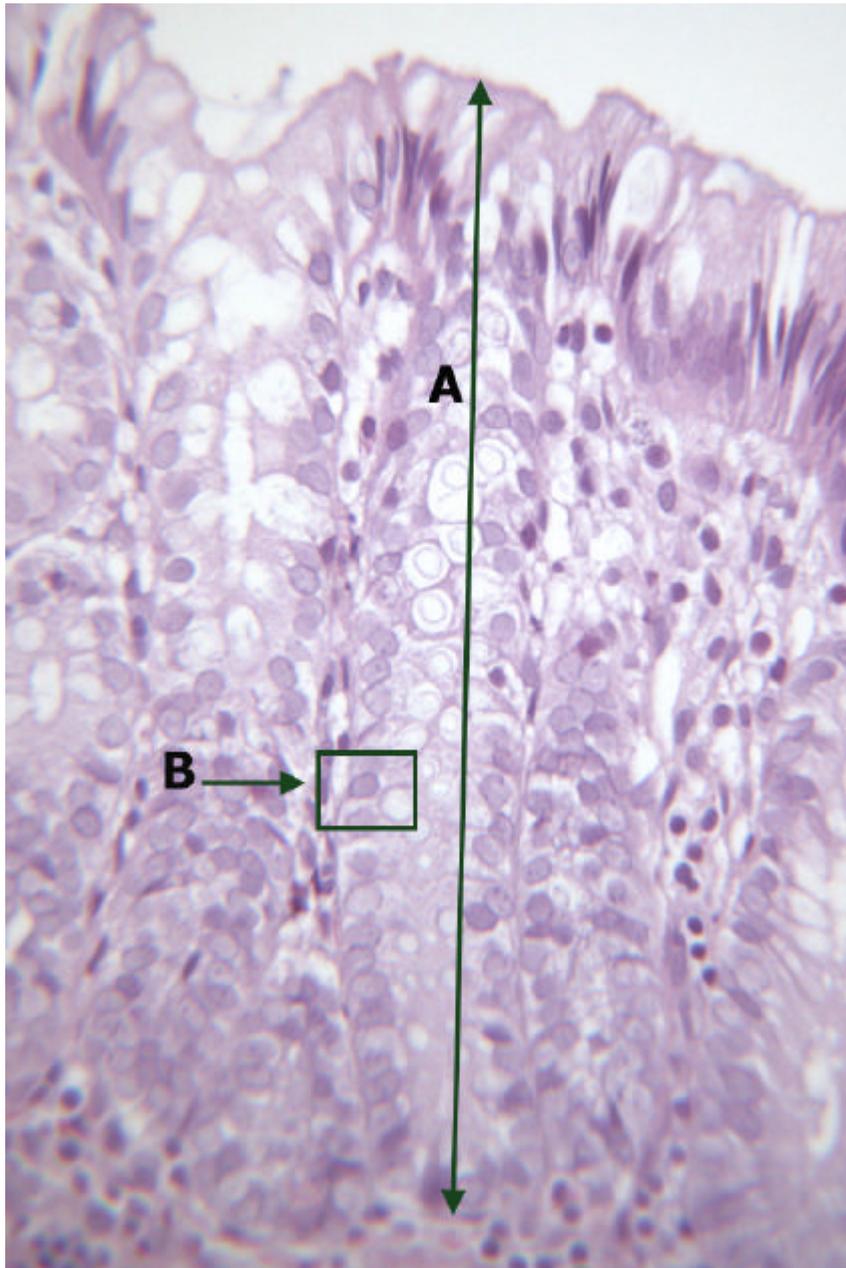
- \* *Obtención de cortes mediante el microtomo.* Antes de realizar los cortes se procedió al desbastado de los bloques de parafina con el fin de que visualmente aparezcan las piezas completamente en la superficie de corte. Los cortes, de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, se efectuaron con un microtomo (Leica modelo RM 2155) sobre las piezas de los tejidos incluidos en bloques de parafina previamente enfriados por su superficie de corte. Luego las láminas inmersas en un baño histológico fueron pescadas con los portaobjetos y guardadas en la estufa a 37 °C durante al menos 1 h.
- \* *Preparación de los cortes antes de la coloración.* La coloración de los cortes histológicos conlleva un proceso en el que se incluye el desparafinado y la hidratación de los mismos. Después se procede a la coloración con hematoxilina-eosina (Rémésy y col., 1993; Ichikawa y Sakata, 1998; Lu y col., 2000) de los portaobjetos con los cortes fijados, así como a una posterior deshidratación, y una fijación definitiva de los cubreobjetos, sobre los cortes ya teñidos, con pegamento antes de su observación al microscopio. Este proceso se detalla a continuación:

- |                |   |   |
|----------------|---|---|
| Desparafinado  | { | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Xilol (15 min)</li> <li>• Alcohol absoluto (5 min)</li> <li>• Alcohol absoluto (5 min)</li> <li>• Alcohol 96% (5 min)</li> <li>• Alcohol 70% (5 min)</li> </ul>                        |
| Hidratación    | { | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua (5 min)</li> </ul>  |
| Coloración     | { | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hematoxilina (10 min)</li> <li>• Agua (5 min)</li> <li>• Eosina (4 min)</li> </ul>   |
| Deshidratación | { | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enjuague con agua</li> <li>• Alcohol 96% (30 seg)</li> <li>• Alcohol absoluto (5 min)</li> <li>• Alcohol absoluto (8 min)</li> <li>• Xilol (5 min)</li> <li>• Xilol (3 min)</li> </ul> |

#### Evaluación morfológica de las preparaciones histológicas

Una vez teñidos los cortes histológicos, éstos fueron observados mediante un microscopio óptico (Axioskop Zeiss) a los siguientes aumentos: x 10, x 20, x 40 y x 60. En la realización del estudio morfológico fue utilizado el programa informático MIP 4 Advanced, evaluándose morfológicamente un número de siete criptas por sección de tejido (colon proximal, colon distal y ciego) y grupo, que incluía a su vez a tres animales, por lo que de cada

grupo y cada sección se analizaron veintiuna criptas. Las mediciones se realizaron con el fin de determinar la altura (ó profundidad) de la cripta (distancia lineal desde la base hasta el ápice de la cripta) y la densidad celular (número células por cripta). La densidad celular se realizó contando el número de células en el lado derecho de la sección axial de una cripta (Howard y col., 1995a; Ichikawa y Sakata, 1998). En la Figura 16 se muestra una imagen de las criptas epiteliales del colon proximal, y las medidas realizadas sobre la misma (A: profundidad de la cripta; B: núcleo de una célula epitelial).



**Figura 16.** Imagen de las criptas epiteliales del colon proximal de ratas. A, muestra la profundidad de la cripta medida en  $\mu\text{m}$ , y B, muestra el núcleo de una de las células epiteliales.

### 3.5.11. Cálculos realizados para la evaluación del balance mineral

En la evaluación del balance mineral se procedió a la determinación del porcentaje de absorción aparente y retención mineral respecto a la ingestión de estos elementos por los animales según el tipo de dieta.

El porcentaje de absorción aparente (AA) es el porcentaje de absorción mineral ingerido respecto al excretado. El porcentaje de la retención (R) se considera como el porcentaje mineral retenido por la rata durante la experiencia respecto al mineral ingerido.

Estos parámetros fueron calculados según las siguientes fórmulas:

$$AA (\%) = \frac{(I - EH)}{I} \times 100$$

$$R (\%) = \frac{(I - EH - EO)}{I} \times 100$$

donde *I* es la cantidad de mineral ingerido por la rata durante el balance; *EH* es la cantidad de mineral excretado en las heces durante el periodo de balance, *EO* es la cantidad de mineral excretado por la orina durante el periodo de la experiencia.

### 3.5.12. Validación de la determinación mineral

La validación de los resultados obtenidos en la determinación mineral mediante espectrofotometría de absorción atómica (Ca, Mg y Fe) y espectrofotometría molecular (P), se llevó a cabo teniendo en cuenta la linealidad del método analítico mediante obtención de la curva de calibrado y el coeficiente de correlación para cada mineral. También se determinó la exactitud del método mediante el ensayo de recuperación, de tal forma que a cada tipo de muestra se añadieron concentraciones conocidas de patrón y mediante el cálculo del porcentaje de recuperación se determinó la exactitud de la técnica. Por último la precisión del método se realizó midiendo una muestra elegida al azar 18 veces en el mismo día y otra 10 veces en días diferentes en tres semanas para cada mineral.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los tres estudios en los que se ha dividido la presente tesis fue realizado un análisis de varianza (ANOVA) para comprobar los efectos de las fuentes de variación medidas en cada uno de ellos (evaluación del crecimiento de bifidobacterias, evaluación de la viabilidad de las bifidobacterias, adición de probióticos y prebióticos a fórmulas infantiles), partiendo de la hipótesis nula de la no existencia de diferencias entre las medias de las variables examinadas. En aquellos casos en los que fueron detectadas diferencias debidas a las anteriores fuentes de variación se realizó un análisis de comparaciones múltiples por parejas utilizando las pruebas de Tukey y Dunnett. La prueba de Tukey fue empleada para comparar el efecto de la fuente de variación entre los grupos problema, mientras que la de Dunnett (prueba de contraste bilateral) se empleó para comparar cada grupo problema con el control.

En el tercer estudio fueron realizados los análisis adicionales que a continuación se detallan. La relación entre el balance mineral (absorción aparente y retención mineral) y el depósito de minerales en fémur y tibia con los parámetros medidos en el lumen intestinal (pH y proliferación de la mucosa: altura de criptas y densidad celular) fue determinado mediante un análisis de correlación controlando el efecto de las diferentes dietas, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, que mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Para predecir la absorción mineral a partir del pH y la proliferación de la mucosa (altura de criptas y densidad celular) fue realizado un análisis de regresión lineal simple o múltiple mediante la técnica de pasos sucesivos, que permite seleccionar diferentes modelos predictivos para explicar el comportamiento de una variable dependiente (absorción mineral) a partir de un gran número de variables independientes. Finalmente, para explicar el depósito mineral en huesos a partir de las variables estudiadas fue realizado un análisis factorial mediante el método de extracción de factores "análisis de componentes principales". Con el análisis factorial se persiguió la reducción de datos para identificar un pequeño número de factores o variables que expliquen la mayoría de la varianza observada. De esta manera se pueden generar hipótesis relacionadas con los mecanismos de depósito mineral en huesos mediante la colinealidad de las variables o su relación de proximidad (o disimilaridad) según su disposición en el espacio métrico representado por todas las variables.

En todos los casos un valor de  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. Los resultados de la presente tesis muestran el valor medio y el error estándar obtenido por triplicado en los dos primeros estudios, mientras que en el tercero se corresponde con los datos obtenidos de seis ratas por dieta. El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS para Windows versión 10.0.6 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1<sup>er</sup> ESTUDIO

#### 1. Evaluación del crecimiento *in vitro* de bifidobacterias y del cambio de pH del caldo de cultivo, en presencia de diferentes oligosacáridos no digeribles (OND)

El crecimiento de una población o cultivo bacterianos se puede expresar en función del aumento de la masa del cultivo o del aumento del número de células. Dentro de los métodos empleados para medir la masa bacteriana de una forma indirecta, están los denominados métodos turbidimétricos (ópticos) cuyo fundamento consiste en medir la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano y que es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo. Uno de los métodos más utilizados es la medición de la luz transmitida a través de la escala de MacFarland (Meyer y col., 1985).

Numerosos estudios han evaluado la fermentación *in vitro* de diferentes OS por las BAL y en particular por las bifidobacterias, así como su crecimiento mediante el uso de la DO a diferentes longitudes de onda (Gómez Zavaglia y col., 1998; Shin y col., 2000a; Crittenden y col., 2001; Perrin y col., 2001).

En la **Tabla 29** se muestra el análisis de varianza para el crecimiento de bifidobacterias (DO y log ufc/mL) y el pH del caldo de cultivo en función del sustrato utilizado, del tiempo de incubación y de la interacción de ambos. El uso de cinco sustratos diferentes influyó significativamente ( $p < 0,001$ ) en el pH del caldo y crecimiento de las bifidobacterias en los cuatro microorganismos estudiados. El paso de los días desde el inicio de la incubación (del día 1 al 7) también influyó significativamente ( $p < 0,001$ ) en el crecimiento de todos los microorganismos cultivados expresados como DO y log ufc/mL y en el pH del caldo de cultivo. Por último, la tabla también muestra que la interacción de ambos factores fue una fuente de variación para la modificación del pH y del crecimiento en todas las bifidobacterias ya que para un sustrato determinado y en un día concreto, la medida del crecimiento y del pH mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre ellas para cada microorganismo.

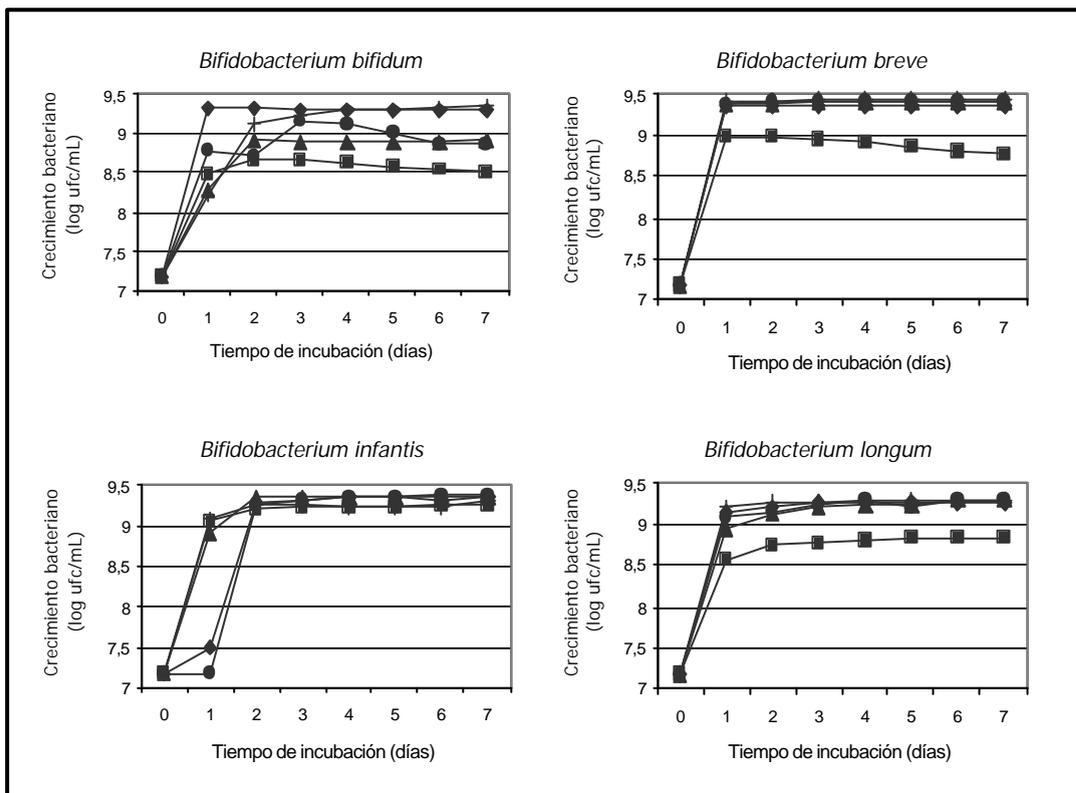
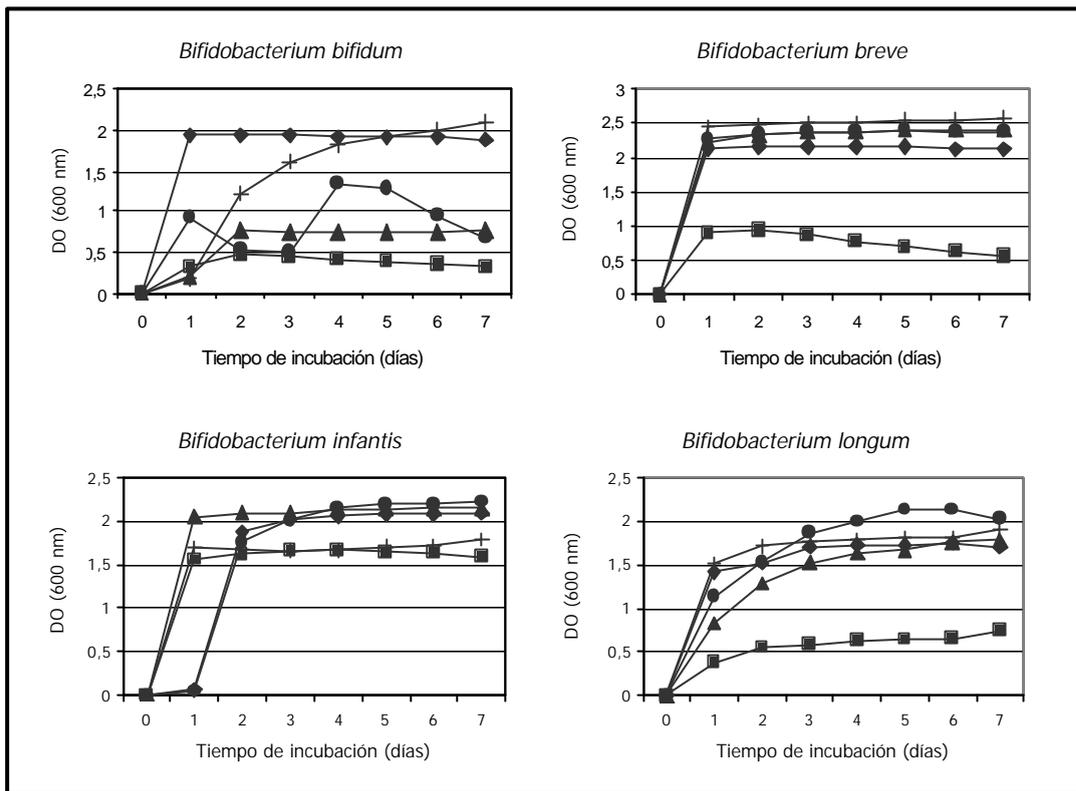
**Tabla 29.** Análisis de varianza del pH del medio de cultivo y del crecimiento de 4 especies de bifidobacterias (expresado en DO y log ufc/mL) utilizando como fuente de variación el sustrato, el tiempo de incubación y la interacción entre ambos

| Fuente de variación | <i>B. bifidum</i> |     |         | <i>B. breve</i> |     |         | <i>B. infantis</i> |     |         | <i>B. longum</i> |     |         |
|---------------------|-------------------|-----|---------|-----------------|-----|---------|--------------------|-----|---------|------------------|-----|---------|
|                     | pH                | DO  | log ufc | pH              | DO  | log ufc | pH                 | DO  | log ufc | pH               | DO  | log ufc |
| Substrato (S)       | ***               | *** | ***     | ***             | *** | ***     | ***                | *** | ***     | ***              | *** | ***     |
| Tiempo (T)          | ***               | *** | ***     | ***             | *** | ***     | ***                | *** | ***     | ***              | *** | ***     |
| S x T               | ***               | *** | ***     | ***             | *** | ***     | ***                | *** | ***     | ***              | *** | ***     |

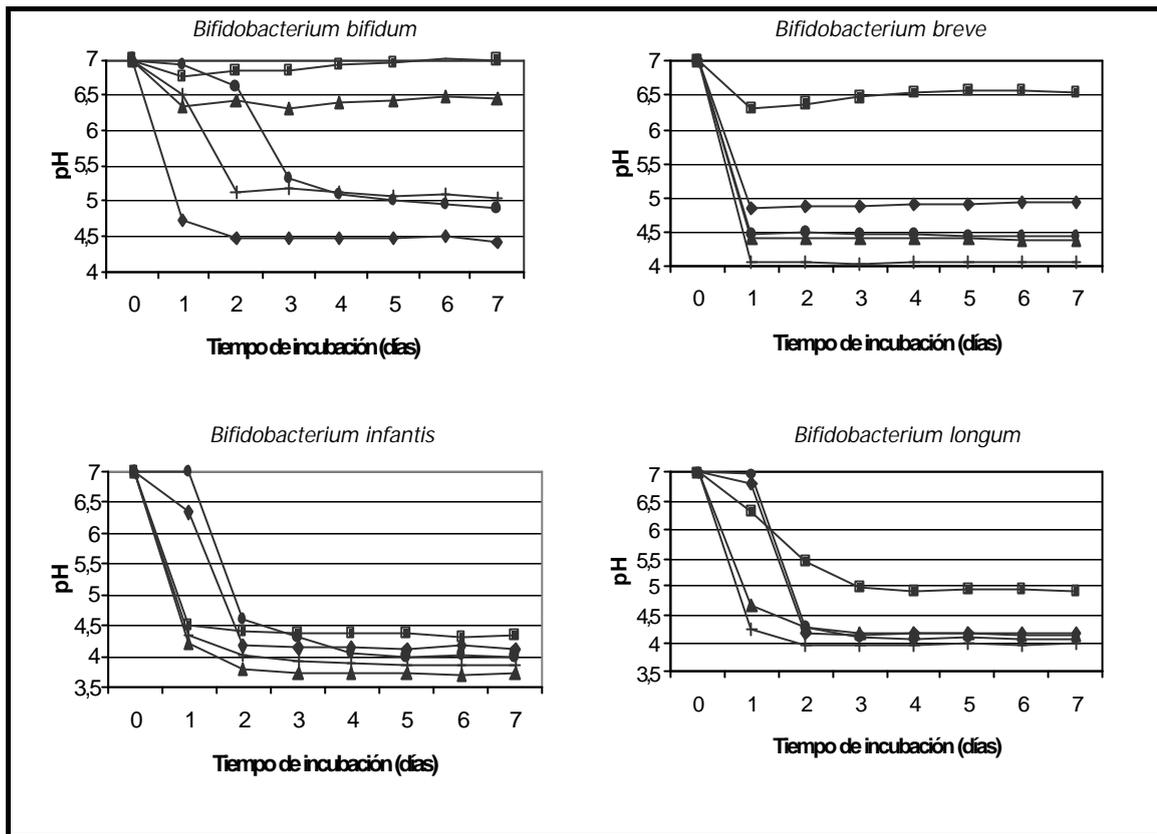
Diferencias significativas para: \*\*\* $p < 0,001$

En la **Figura 17** se observa el crecimiento bacteriano, expresado como DO y log ufc/mL, a lo largo los siete días de incubación de las bifidobacterias con cinco sustratos diferentes. Para ello se estableció una relación entre la DO del caldo de cultivo y la concentración bacteriana expresada en ufc/mL a través de la escala de MacFarland. De forma general el patrón de crecimiento bacteriano siguió una tendencia similar en todos los casos, salvo *B. bifidum*, con un crecimiento exponencial a las 24 h de incubación y posteriormente un crecimiento más sostenido hasta el 7º día. En el caso de *B. bifidum*, se observó un crecimiento rápido y exponencial cuando el sustrato empleado fue la glucosa, con los FOS cc fue más sostenido y en los tres últimos días sufrió un retroceso. Con el resto de sustratos no se produjo un claro crecimiento hasta el 2º día, manteniéndose más bajo con oligofruktosa e inulina, e incrementándose progresivamente con 4'-GOS hasta obtenerse un mayor crecimiento con este sustrato al final del estudio (7º día). *B. breve* mostró un crecimiento exponencial en las primeras 24 h con todos los sustratos excepto con la inulina, manteniéndose el crecimiento hasta el último día. Sin embargo, con la inulina el crecimiento observado fue bastante menor y a partir del 3º día se produjo un leve descenso en el mismo. Para *B. infantis*, el crecimiento exponencial con los FOS cc y la glucosa no se produjo hasta el 2º día. Con todos los sustratos se obtuvo un crecimiento similar, excepto con 4'-GOS e inulina que fue algo menor. En el caso de *B. longum*, se reprodujo el patrón de crecimiento ya comentado excepto con la inulina, donde la fase exponencial de crecimiento fue bastante pequeña y el crecimiento con este sustrato a lo largo de los siete días fue más bajo que con el resto de hidratos de carbono.

En la **Figura 18** se observa la variación de los valores de pH del caldo de cultivo a lo largo los siete días de incubación de las bifidobacterias con cinco sustratos diferentes. El pH en el momento de añadir el inóculo bacteriano era de 7,00 y en todos los casos se observó que tras las primeras 24 h de incubación éste había descendido al menos en 0,5 puntos, excepto para los FOS cc cuando sirvieron de sustrato a *B. bifidum* (6,94), *B. infantis* (7,00) y *B. longum* (6,96), la inulina con *B. bifidum* (6,78) y la glucosa con *B. longum* (6,81). En el caso de *B. bifidum*, la adición de inulina al caldo al cultivo prácticamente no modificó el pH, y con la oligofruktosa sólo lo hizo en 0,5 puntos. Con el resto de sustratos el descenso del pH del caldo de cultivo fue más o menos acusado, destacando el caso de la glucosa. Para *B. breve*, se produjo un descenso bastante pronunciado de los valores de pH excepto con la inulina que sólo descendió hasta 6,5, mientras que el resto se mantuvo entre 4 y 5. Con el cultivo de *B. infantis* a las 24 h de incubación con todos los sustratos se obtuvieron unos valores de pH entorno a 4,5 excepto con los FOS cc que se mantuvieron prácticamente en 7 y con la glucosa que descendieron a 6,32. Sin embargo a partir del 2º día todos los valores se mantuvieron hasta el final entre 4,50 y 3,50. En el caso de *B. longum*, únicamente la glucosa y el 4'-GOS produjeron un descenso de pH significativo a las 24 h. Sin embargo, fue la inulina la que mantuvo unos valores de pH menos bajos (5,0).



**Figura 17.** Gráficos de medias obtenidas para la interacción del tiempo de incubación con el sustrato, donde se muestra el crecimiento de las bifidobacterias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*) mediante la medición de cambios en la DO y log ufc/mL. Los sustratos empleados fueron glucosa (♦) y diferentes oligosacáridos [FOS cc (●), inulina (■), oligofruktosa (▲) y 4'-GOS (+)]



**Figura 18.** Gráficos de medias obtenidas para la interacción del tiempo de incubación con el sustrato, donde se muestran los cambios de pH en el caldo TPY [glucosa (◆), FOS cc (●), inulina (■), oligofruktosa (▲) y 4'-GOS (+)] incubado con bifidobacterias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*)

El empleo de la escala MacFarland tiene el inconveniente de ser un método poco preciso, por lo que ha sido desplazado por métodos espectrofotométricos en los que se mide la DO del cultivo, es decir la absorbancia (Meyer y col., 1985). Así pues, en la **Tabla 30** se muestran los valores finales de crecimiento (DO) de bifidobacterias y de pH de caldo de cultivo tras siete días de incubación con cinco sustratos diferentes. Se puede establecer que en el 7<sup>o</sup> día de incubación y para todas las bifidobacterias, fueron los sustratos 4'-GOS y FOS cc los que estimularon el crecimiento bacteriano en mayor medida (2,07 en *B. bifidum* y 2,59 en *B. breve* para 4'-GOS y 2,22 en *B. infantis* y 2,03 en *B. longum* para FOS cc). En cambio, la inulina fue el sustrato que menos estimuló el crecimiento bacteriano en todos los casos tras siete días de incubación. En cuanto a los valores de pH del caldo de cultivo al 7<sup>o</sup> día de incubación, fueron de nuevo los sustratos 4'-GOS y FOS cc los que produjeron un mayor descenso del pH del caldo de cultivo, y la inulina la que menos acidificó el pH al final del estudio. Se puede establecer por tanto una relación directa entre el crecimiento bacteriano y el descenso de pH, el cual se hace más evidente para *B. breve* y *B. longum*. En las otras dos especies de bifidobacterias no ocurrió esta relación, puesto que para *B. bifidum* se obtuvo un mayor crecimiento con el 4'-GOS y un descenso de pH más pronunciado cuando fue cultivado con la

glucosa y los FOS cc, y *B. infantis* presentó un mayor crecimiento con los FOS cc y sin embargo fue con la oligofruktosa y el 4'-GOS con los que mostró un menor pH.

**Tabla 30.** Valores finales de crecimiento de bifidobacterias expresado como densidad óptica (DO) y de pH del caldo de cultivo obtenidos al 7<sup>o</sup> día de incubación

| <i>Bifidobacterium</i> spp. | Substratos    | DO                      | pH                       |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>B. bifidum</i>           | glucosa       | 1,88±0,001 <sup>b</sup> | 4,40±0,020 <sup>e</sup>  |
|                             | FOS cc        | 0,68±0,002 <sup>d</sup> | 4,89±0,015 <sup>d</sup>  |
|                             | inulina       | 0,34±0,001 <sup>e</sup> | 7,02±0,026 <sup>a</sup>  |
|                             | oligofruktosa | 0,77±0,002 <sup>c</sup> | 6,42±0,025 <sup>b</sup>  |
|                             | 4'-GOS        | 2,07±0,001 <sup>a</sup> | 5,04±0,015 <sup>c</sup>  |
| <i>B. breve</i>             | glucosa       | 2,14±0,001 <sup>d</sup> | 4,94±0,020 <sup>b</sup>  |
|                             | FOS cc        | 2,38±0,001 <sup>c</sup> | 4,45±0,010 <sup>c</sup>  |
|                             | inulina       | 0,57±0,003 <sup>e</sup> | 6,56±0,020 <sup>a</sup>  |
|                             | oligofruktosa | 2,39±0,001 <sup>b</sup> | 4,42±0,036 <sup>c</sup>  |
|                             | 4'-GOS        | 2,59±0,001 <sup>a</sup> | 4,06±0,015 <sup>d</sup>  |
| <i>B. infantis</i>          | glucosa       | 2,09±0,002 <sup>c</sup> | 4,09±0,020 <sup>b</sup>  |
|                             | FOS cc        | 2,22±0,002 <sup>a</sup> | 3,89±0,083 <sup>bc</sup> |
|                             | inulina       | 1,59±0,012 <sup>e</sup> | 4,33±0,015 <sup>a</sup>  |
|                             | oligofruktosa | 2,17±0,004 <sup>b</sup> | 3,75±0,046 <sup>c</sup>  |
|                             | 4'-GOS        | 1,79±0,017 <sup>d</sup> | 3,87±0,017 <sup>c</sup>  |
| <i>B. longum</i>            | glucosa       | 1,70±0,007 <sup>d</sup> | 4,20±0,020 <sup>b</sup>  |
|                             | FOS cc        | 2,03±0,031 <sup>a</sup> | 4,09±0,026 <sup>d</sup>  |
|                             | inulina       | 0,74±0,002 <sup>e</sup> | 4,94±0,030 <sup>a</sup>  |
|                             | oligofruktosa | 1,78±0,002 <sup>c</sup> | 4,15±0,015 <sup>c</sup>  |
|                             | 4'-GOS        | 1,91±0,010 <sup>b</sup> | 4,00±0,006 <sup>e</sup>  |

Cada valor es la media±error típico, n=3

<sup>a-e</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna muestran diferencias significativas para p<0,001

Así pues, de forma general se puede concluir que la inulina fue el sustrato con el que todas las bifidobacterias crecieron en menor medida y cuya fermentación dio lugar a un descenso del pH del caldo de cultivo menos acusado. Este hecho coincide con el descrito por Shin y col. (2000a) que evaluaron el crecimiento de dos cepas de *B. bifidum* en leche desnatada fermentada en presencia de FOS cc, GOS e inulina, y observaron que la inulina fue el menos efectivo en la estimulación del crecimiento bacteriano tras 48 h de incubación a 37 °C. Los autores señalaron que fue necesaria una concentración de un 5% de inulina para observar diferencias significativas (p<0,05) con los controles, y que la producción de ác. acético y ác. láctico medida en el cultivo fue menor (p<0,05) en las cepas que crecieron en presencia de inulina.

Recientemente Crittenden y col. (2001) evaluaron *in vitro* el crecimiento de *B. lactis* B94 con diferentes OS y monosacáridos. Observaron que *B. lactis* B94 fue capaz de crecer mejor con FOS, GOS y XOS que con sus unidades de monosacárido, la fructosa, la galactosa y la xilosa, mostrando unos valores de crecimiento medidos como DO a 600 nm en orden decreciente como sigue: glucosa (1,9) > GOS (1,6) > FOS cc (1,2) > oligofruktosa (1,0) > inulina (0,7). Nuestros datos mostraron una tendencia muy similar a la descrita por Crittenden y col., siendo 4'-GOS y FOS cc los sustratos con los que se obtuvieron los mayores crecimientos

bacterianos a lo largo de los siete días de incubación con cualquiera de las bifidobacterias empleadas. Una posible explicación a las diferencias encontradas en la fermentación de los hidratos de carbono es su GP. Así pues, mientras que la inulina es la que posee un GP mayor (entre 10 y 60), FOS cc y 4'-GOS poseen menor GP (de 2 a 3 y de 3 a 5, respectivamente). Se ha descrito mediante fermentación *in vitro* de la inulina y los productos derivados de su hidrólisis por bacterias fecales humanas, que las moléculas con un GP < 10 son fermentadas dos veces más rápido que las que tienen un GP > 10 (Roberfroid y col. 1998). Este fenómeno ha sido observado con diversos OS también para las bifidobacterias por varios autores (Gibson y Wang, 1994a; Hopkins y col., 1998; Bielecka y col. 2002). Además, se ha sugerido que estos microorganismos tienen mecanismos de transporte de sustratos específicos, que son más eficientes para el transporte de OND que para el de azúcares simples. En cualquier caso, en nuestro estudio se observó que la fermentación de la glucosa dio lugar a un mayor crecimiento bacteriano que la inulina en todas las bifidobacterias. En este sentido, en un estudio fermentación *in vitro* realizado por Degnan y Macfarlane (1991) utilizando como sustratos los azúcares arabinosa, manosa, xilosa, glucosa y galactosa, los mayores rangos de crecimiento se alcanzaron con los dos últimos. *B. longum*, *B. bifidum* y *B. infantis* obtuvieron el mayor crecimiento con glucosa, mientras que *B. breve* lo obtuvo con galactosa.

En cuanto a la acidificación del caldo de cultivo, el 4'-GOS fue el sustrato con el que se alcanzó un valor de pH más ácido a lo largo de los siete días de incubación con *B. breve* y *B. longum*, siendo además *B. infantis* el que alcanzó menores valores de pH con cualquiera de los sustratos empleados.

En un medio sintético, las bifidobacterias se caracterizan por producir 3 moles de ác. acético y 2 moles de ác. láctico por cada 2 moles de glucosa (Scardovi y Trovatelli, 1965). Por tanto y *a priori*, ya que en nuestro estudio no se midieron los ácidos orgánicos producidos por la fermentación de los OS, con 4'-GOS las bifidobacterias generaron una mayor cantidad de éstos ácidos, que son los metabolitos generados en la fermentación anaerobia de dichos sustratos. Los valores de pH obtenidos en este estudio podrían considerarse bajos a los registrados en otros estudios, sin embargo varios autores han obtenido valores similares. Así, Dubey y Mistry (1996) evaluaron el crecimiento de 4 especies de bifidobacterias (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*) en tres fórmulas infantiles durante 24 h. *B. bifidum* y *B. breve* fueron los que alcanzaron un menor pH (4,1 y 4,0, respectivamente) con una fórmula con base de leche. En nuestro estudio los menores valores de pH con 4'-GOS a las 24 h fueron obtenidos con *B. breve* y *B. longum* (4,08 y 4,16, respectivamente) para terminar a los 7 días siendo de 4,06 y 4,00 respectivamente. Sin embargo, Ustunol y Gandhi (2001) evaluaron el crecimiento de dos cepas de *B. bifidum* en leche desnatada desecada con un 5% de miel (4-5% de OS en su composición), sacarosa, fructosa o glucosa durante 48 h. Los valores de pH a las 48 h fueron de 3,61 para la miel y de 3,67 para la glucosa. Este menor pH con la miel se tradujo en una mayor concentración de ác. acético y láctico con este sustrato. En nuestro caso *B. bifidum* a las 48 h obtuvo el pH más reducido con la glucosa (4,46) mientras que con el resto de

substratos no descendió de 5. En otro estudio con mayor tiempo de incubación, Marx y col. (2000) describieron que el crecimiento de *B. breve* y *B. longum* alcanzó su máximo nivel tras 20-25 h de incubación en presencia de  $\beta$ -(2,6)-FOS, manteniéndose constante hasta el 5º día. Durante el crecimiento los valores de pH del medio descendieron, principalmente debido a la producción de ácidos orgánicos. El pH inicial fue de 6,5 y descendió hasta 5 con *B. breve*, y 5,3 con *B. longum* en 24 h, y se mantuvo prácticamente constante hasta el final. Tal y como se ha descrito anteriormente, en nuestro estudio la fase de mayor crecimiento bacteriano y mayor acidificación del medio se produjo en las primeras 24 h, para mantenerse constante el resto del tiempo.

Los valores de pH más bajos encontrados en el caldo de cultivo con *B. breve* y *B. infantis* cuando crecieron con 4'-GOS respecto a FOScc e inulina también fue descrito por Kajiwara y col. (2002) tras incubar 48 h estos microorganismos en presencia de GOS, FOScc e inulina al 5%, y fue debido a una mayor producción de ác. láctico en ambos casos.

Rycroft y col. (2001) evaluaron *in vitro* la fermentación de distintos OS por bifidobacterias durante 24 h, y observaron que los OS que contenían galactosa (lactulosa, GOS y SOS) fueron más efectivos que los que contenían fructosa (oligofructosa e inulina) en el incremento del número de bifidobacterias. Además, concluyeron que IOS y GOS fueron los prebióticos más efectivos ya que incrementaron el número de bifidobacterias ejerciendo poco efecto sobre el resto de grupos bacterianos (clostridios, bacteroides, lactobacilos, estreptococos y *E. coli*), incrementaron significativamente la producción de lactato y produjeron los volúmenes de gas más bajos. Este efecto también fue observado por Djouzi y Andrieux (1997) en un estudio con ratas con flora humana asociada, donde los GOS incrementaron el número de bifidobacterias en mayor medida que los FOS.

De los resultados desprendidos en el presente estudio podemos afirmar que de los substratos evaluados el 4'-GOS fue el que estimuló en mayor medida el crecimiento *in vitro* de las bifidobacterias que con mayor frecuencia se encuentran en las heces infantiles. En cuanto a las bifidobacterias que mejor crecieron con el 4'-GOS fueron *B. breve* y *B. bifidum*, y las bifidobacterias que al fermentar dicho OS descendieron en mayor medida el pH del caldo de cultivo fueron *B. breve* y *B. longum*.

Con los resultados obtenidos en este primer estudio, el siguiente paso fue elaborar distintas variantes de una fórmula infantil comercial mediante la adición de los probióticos y los prebióticos previamente seleccionados. Puesto que la elaboración de la fórmula probiótica suponía mantener unas condiciones de elaboración muy estrictas de asepsia y anaerobiosis en el momento de añadir el microorganismo probiótico, se optó por seleccionar entre las fórmulas probióticas disponibles en el mercado, la que proporcionase una combinación de las especies de bifidobacteria seleccionadas en nuestro estudio. Así pues, se seleccionó una fórmula probiótica que contenía *B. bifidum* y *B. longum*, dos de las especies que con mayor frecuencia se aíslan en niños alimentados con lactancia materna (Mitsuoka, 1982; Rasic y Kurmann, 1983), y una

fórmula infantil comercial para emplearla como base de ésta fórmula probiótica. Para la elaboración de las fórmulas prebióticas se empleó la misma fórmula infantil comercial a la que se le adicionó en este caso distintas concentraciones de 4'-GOS. Por último también se elaboraron fórmulas simbióticas que contenían tanto los probióticos como los prebióticos seleccionados. La fórmula infantil empleada como base para elaborar las dietas prebióticas, probióticas y simbióticas fue utilizada como control en los estudios posteriores.

## 2º ESTUDIO

A partir de los resultados obtenidos en el primer estudio, fue seleccionada una fórmula infantil probiótica que contenía *B. bifidum* y *B. longum* en su composición por ser dos de las especies que mejor crecieron *in vitro* con el OND (4'-GOS) propuesto como prebiótico en el estudio previo. El objetivo del segundo estudio fue evaluar la viabilidad de las bifidobacterias presentes en la fórmula infantil probiótica durante el periodo de tiempo que ésta estaría siendo consumida según las especificaciones del fabricante, y que dependiendo de la edad del niño abarca un tiempo entre seis y catorce días.

### 2. Evaluación del grado de viabilidad de las bifidobacterias en las fórmulas infantiles

Algunos estudios (Klaver y col., 1993; Dave y Shah, 1997) han mostrado que las bifidobacterias crecen poco en la leche y no sobreviven bien en el producto final. El mantenimiento de la viabilidad de las bifidobacterias en la leche y productos lácteos fermentados ha sido un reto para los fabricantes de productos lácteos ya que estos microorganismos requieren para crecer un potencial de oxidación-reducción bajo (Shimamura y col., 1992) y son sensibles a valores de pH bajos, condiciones que no se dan de forma natural en la leche fermentada. También requieren factores de crecimiento específicos (Klaver y col., 1993; Modler, 1994). Sin embargo, varios investigadores han descrito la viabilidad de las bifidobacterias en diferentes productos lácteos, como la leche fermentada (Medina y Jordano, 1994), el queso (Roy y col., 1997), los postres lácteos fermentados congelados (Laroia y Martin, 1991), los helados (Hekmat y McMahon, 1992) y el yogurt (Shah y col., 1995).

Para que las bifidobacterias produzcan efectos terapéuticos, se ha recomendado que éstas sean viables y que se ingieran en cantidades superiores a  $10^6$  células/g (Kurmman y Rasic, 1991). En Japón, la Asociación de leches fermentadas y bebidas acidolácticas ha establecido un estándar que requiere que más de  $10^7$  células/g estén presentes en los productos lácteos que reclaman contener bifidobacterias (Ishibashi y Shimamura, 1993). La Regulación alimentaria suiza así como el International Standard de FIL/IDL requieren que tales productos contengan más de  $10^6$  células/g de bifidobacterias (Shin y col., 2000b).

Los principales factores a los que se les ha atribuido el provocar una pérdida de la viabilidad de las bacterias probióticas son el descenso del pH del medio y la acumulación de ácidos orgánicos, como resultado del crecimiento y la fermentación por los microorganismos de los substratos disponibles en el producto lácteo (Shah y Jelen, 1990). Además, debido a las características de las bifidobacterias, su número en los alimentos puede sufrir un descenso debido a la presencia de  $O_2$  disuelto, a sus derivados como el  $H_2O_2$ , superóxido y radicales hidroxilo (Carlsson y col., 1978), y a la permeabilidad al  $O_2$  del envase. La disponibilidad de factores de crecimiento también afecta a la viabilidad de las cepas probióticas en los productos lácteos (Shah, 2000).

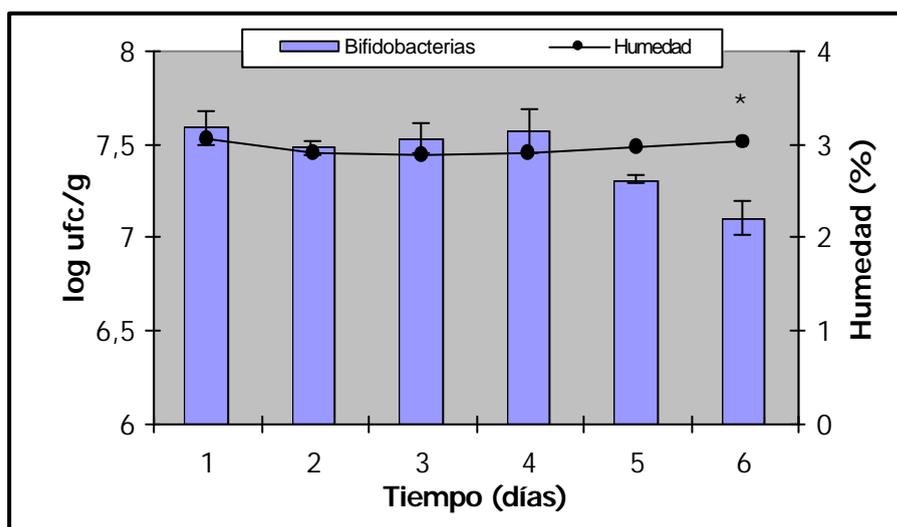
En la **Tabla 31** se muestra el análisis de varianza del recuento de bifidobacterias, pH y humedad de las muestras en los estudios de seis y catorce días respectivamente, y que representan el periodo mínimo y máximo de consumo de la fórmula infantil por el niño. En todos los casos, excepto en la humedad de la muestra en el estudio de seis días, existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) a lo largo del tiempo en las variables estudiadas, sin que esto haya supuesto una pérdida de la dosis mínima efectiva de bifidobacterias en el producto, tal y como se muestra en las dos siguientes figuras.

**Tabla 31.** Análisis de varianza del recuento de bifidobacterias en las fórmulas infantiles durante el periodo de consumo por el lactante (6 y 14 días)

|         | Viabilidad 6 días | Viabilidad 14 días |
|---------|-------------------|--------------------|
| log ufc | **                | ***                |
| pH      | ***               | ***                |
| Humedad | NS                | **                 |

Diferencias significativas para: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; NS=no significación

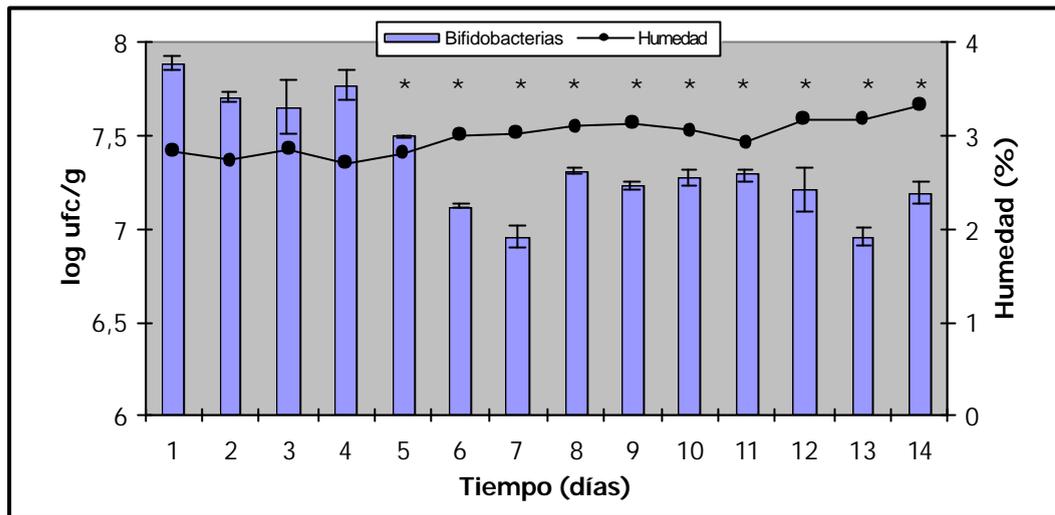
En las **Figuras 19 y 20** se muestra la evolución del recuento de las bifidobacterias en las fórmulas infantiles probióticas tanto en el periodo de seis como en el de catorce días. Como control se empleó la fórmula infantil utilizada como base para la elaboración de la fórmula probiótica, y que por tanto no posee ningún tipo de bifidobacteria en su formulación. Los resultados obtenidos con la fórmula empleada como control no se muestran ya que durante los catorce días en los que se realizó la microbiología para detectar la posible presencia de bifidobacterias, no se observó crecimiento bacteriano alguno en las muestras analizadas.



**Figura 19.** Viabilidad de las bifidobacterias de la fórmula infantil durante el periodo de consumición del bote (6 días) y humedad de la fórmula durante dicho periodo

\* La presencia de asteriscos indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los recuentos de bifidobacterias del día 2 al 6 con respecto al primer día, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

En el primer estudio (**Figura 19**) se tomaron muestras de la fórmula infantil probiótica durante seis días consecutivos. Como se puede observar, los recuentos iniciales presentaron un valor de 7,59 log ufc/g de muestra que se mantuvieron sin mostrar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) durante los 5 primeros días. Al 6º día los recuentos descendieron significativamente ( $p < 0,05$ ) hasta 7,10 log ufc/g de muestra, manteniéndose en todo caso por encima del valor recomendado de  $10^6$  células/g para que el producto tenga efecto en el organismo.



**Figura 20.** Viabilidad de las bifidobacterias de la fórmula infantil durante el periodo de consumición del bote (14 días) y humedad de la fórmula durante dicho periodo.

\* La presencia de asteriscos indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los recuentos de bifidobacterias del día 2 al 14 con respecto al primer día, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

En el segundo estudio (**Figura 20**), los niveles iniciales observados de bifidobacterias fueron algo mayores (7,88 log ufc/g de muestra), y se mantuvieron hasta el 4º día sin mostrar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). El resto de los días y hasta el día catorce de incubación los recuentos fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores al recuento del primer día, reduciéndose hasta 7,19 log ufc/g de muestra. Al igual que en el estudio previo el recuento obtenido el último día también se mantuvo por encima del valor recomendado, siendo algo superior en este caso probablemente porque los valores iniciales también lo fueron.

En ambos estudios se realizó paralelamente una medición del grado de humedad de la muestra para comprobar que un posible y acentuado descenso en el número de bifidobacterias pudiera ser debido a un aumento del contenido de agua de la muestra. En ninguno de los dos estudios se observó un aumento acusado del nivel de humedad, oscilando entre 2,70 y 3,33% en el estudio de catorce días.

Otro parámetro que podía afectar a la viabilidad de las bifidobacterias es el pH, por lo que éste también fue medido en la muestra que se utilizó para realizar la siembra microbiológica en ambos estudios. El pH tanto en el estudio de seis como de catorce días osciló entre 7,06 el día 1 y 6,74 el día 14, valores que están muy por encima de los señalados en otros estudios

como causa importante del deterioro de la viabilidad de las bifidobacterias añadidas sobretodo a leches fermentadas.

Por último y para obtener un valor numérico del grado de viabilidad de las bifidobacterias de las fórmulas infantiles tanto a los seis como a los catorce días, se ha relacionado el recuento final (6° y 14° día) con el inicial (1<sup>er</sup> día), obteniéndose un valor de un 32,19% de viabilidad para el estudio de seis días, y una viabilidad del 25,55% para el de catorce días.

La mayoría de los estudios de viabilidad de bifidobacterias en productos lácteos encontrados en la bibliografía científica se refieren a yogures o leches fermentadas conservados en refrigeración durante varias semanas. En algunos de estos estudios (Yaguchi, 1984; Reuter 1990; Hughes y Hoover, 1995) se ha observado una pérdida de la viabilidad bacteriana, más pronunciada en leche fermentada que en la leche no fermentada, manteniendo recuentos de bifidobacterias por encima de 10<sup>6</sup> ufc/mL tras quince días de almacenamiento la primera, y la segunda después de 28 días. En otros trabajos ha sido descrito una pérdida de viabilidad de hasta un 82% de *B. infantis* en leche desnatada con un pH de 4,3 (Lankaputhra y col., 1996). En nuestro estudio la viabilidad de las bifidobacterias se mantuvo por encima del nivel recomendado durante catorce días, posiblemente debido a que el pH de la leche no descendió por debajo de 6,74. Resultados similares de viabilidad fueron obtenidos por Shin y col. (2000b) en dos leches no fermentadas que contenían bifidobacterias y mantenidas a 4 °C, los autores señalaron que el pH en ambos casos se mantuvo en valores de 6,6 ó superiores.

Nosotros empleamos *B. bifidum* y *B. longum* como microorganismos probióticos en base a los resultados obtenidos en el primer estudio, y mediante este estudio hemos constatado su viabilidad en la fórmula infantil durante catorce días. A pesar de que no existan muchos estudios en los que se compare la capacidad de las diferentes especies de bifidobacteria de mantenerse viables en los productos a los que se añaden, ha sido descrito que *B. bifidum* fue ligeramente más estable que *B. breve* tanto en leches fermentadas como no fermentadas vendidas en Japón (Reuter, 1990). También ha sido descrito que una forma de aumentar la viabilidad de *B. bifidum* en leche desnatada fermentada es la adición de un 5% de FOS cc ó de GOS a la misma, consiguiendo unos valores de 67,3 y 52,2% respectivamente, frente al 11,6% de la leche control (Shin y col. 2000a).

Aunque los porcentajes de viabilidad en nuestro estudio no sean muy elevados, como hemos visto los recuentos se mantienen siempre por encima de las recomendaciones. Esto podría ser debido por otra parte a las ventajas que presenta la fórmula infantil en polvo sobre otros productos lácteos, como es su conservación a temperatura ambiente, el envasado en atmósfera protectora hasta el momento de su apertura, la escasa humedad del producto, la estabilidad en el pH y el empleo de un material no permeable al O<sub>2</sub> para el envasado, puesto que se ha observado una pérdida importante de la viabilidad de las bifidobacterias añadidas a yogures envasados en recipientes de plástico en comparación con los contenidos en botellas de cristal (Dave y Shah, 1997).

### 3. Composición de la flora fecal de bebés alimentados con fórmula infantil probiótica

Una vez comprobada la viabilidad de las bifidobacterias de la fórmula infantil probiótica y que sus recuentos se han mantenido por encima del nivel mínimo recomendado de  $10^6$  células/g durante los catorce días de consumo del producto, se planteó un segundo objetivo, que consistió en la evaluación de la composición de la flora fecal infantil durante el primer año de vida en función de su alimentación y más concretamente de la ingestión de una fórmula probiótica (FP). Para ello, se administró la FP a un grupo de niños, y a otro grupo de niños una fórmula control (FC), que consistió en la fórmula infantil utilizada como base para elaborar la anterior. En la Tabla 23 de la sección Material y Métodos se muestra la pauta de alimentación seguida en los cinco niños utilizados en el presente estudio.

La composición de la microflora residente en el tracto GI de los niños ha sido determinada ampliamente mediante técnicas de cultivo estándar y caracterizaciones fenotípicas (basadas en la morfología de la colonia y determinados marcadores bioquímicos tales como actividades enzimáticas y productos finales del metabolismo). Sin embargo, estos métodos de cultivo tradicionales sólo pueden mostrar una parte de la gran diversidad microbiana presente en el colon infantil, ya que sólo son aplicables a bacterias cultivables y con bastante frecuencia los medios elegidos no son selectivos para la especie o género bacteriano requerido (Silvi y col., 1996; Hartemink y Rombouts, 1999).

Así en los últimos años se están empleando con gran éxito técnicas de biología molecular para el estudio de la microflora del tracto GI. En los procariontes el análisis comparativo del ARN ribosomal, en particular de los genes 16S y 23S ARNr, se han empleado en la identificación de las bacterias desde nivel de género hasta especie o cepa (Langendijk y col., 1995). En particular, la reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores 16S ARNr se ha aplicado con éxito en la detección y cuantificación de los anaerobios predominantes en la heces tanto de niños como adultos (Wang y col., 1996), así como en el seguimiento de *Bifidobacterium* como probiótico en las heces de niños alimentados con una fórmula infantil instantánea que contiene dicha cepa (Kok y col., 1996b).

El presente estudio se realizó con las técnicas de microbiología convencionales puesto que el número de microorganismos a investigar fue reducido, así como por el hecho de que los medios de cultivos empleados para su recuento en placa están suficientemente aceptados en la bibliografía científica como adecuados para las bacterias investigadas: anaerobios totales, bacteroides, bifidobacterias y clostridios.

En la **Tabla 32** se muestra el análisis de varianza de los recuentos microbiológicos y pH fecales de los cinco bebés alimentados con FC ó FP durante el 1<sup>er</sup> año de vida. En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ), debido a que la alimentación durante el 1<sup>er</sup> año de vida del bebé influyó significativamente en el recuento microbiológico fecal y éste a su vez en los valores finales de pH fecal debidos a la producción de ác. orgánicos.

**Tabla 32.** Análisis de varianza de los recuentos de la microbiota fecal infantil y del pH a lo largo del 1<sup>er</sup> año de vida entre los grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica

| Microorganismo            | Bebé 1 | Bebé 2 | Bebé 3 | Bebé 4 | Bebé 5 |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Anaerobios totales</b> | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>Bacteroides</b>        | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>Bifidobacterias</b>    | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>Clostridios</b>        | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>pH</b>                 | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |

Diferencias significativas para: \*\*\* $p < 0,001$

En la **Tabla 33** se muestran los recuentos (log ufc/g heces) de los anaerobios totales, bacteroides, bifidobacterias y clostridios encontrados en cinco bebés durante el primer año de vida, dos de ellos alimentados con una FC y los otros tres con la misma FP. Tal y como se recomienda (ESPGAN, 1981), la FP no se les administró a los bebés problema hasta los cuatro meses de edad. Los dos primeros recuentos se caracterizaron por presentar una menor cantidad de bacteroides (excepto el bebé 5 en el 1<sup>er</sup> mes) y clostridios (excepto en el 3<sup>er</sup> mes) en los bebés alimentados con FP que los alimentados con FC, a pesar de estar todos ellos a base de leche materna y/o fórmula infantil de inicio. El recuento de bifidobacterias en este periodo se caracterizó por ser muy similar entre todos los bebés y por disminuir a los tres meses de edad (excepto en el bebé 2). En el bebé 1, alimentado con FC, los recuentos de bifidobacterias y clostridios se mantuvieron sin cambios a lo largo del tiempo, mientras que el de bacteroides disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ). Los recuentos de bacteroides y clostridios en el bebé 2 alimentado con FC no presentaron una tendencia clara en el tiempo, sin embargo el contenido de bifidobacterias disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) con la edad (de 7,12 log ufc/g al mes de edad hasta 6,62 log ufc/g al año de edad). Entre los bebés alimentados con FP el recuento de bacteroides con el tiempo se mantuvo sin cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en el bebé 3 (de 6,71 log ufc/g al mes de edad hasta 6,84 log ufc/g al año de edad), aumentó de forma significativa ( $p < 0,05$ ) hasta el 9<sup>o</sup> mes en el bebé 4 (7,35 log ufc/g) ó hasta el 7<sup>o</sup> mes en el bebé 5 (7,90 log ufc/g), para disminuir posteriormente de forma significativa ( $p < 0,05$ ). En cuanto a los clostridios, se produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) a partir del 7<sup>o</sup> mes en el bebé 1 (6,10 log ufc/g), en el 12<sup>o</sup> mes en el bebé 4 (7,68 log ufc/g), y sin mostrar una clara tendencia y terminar disminuyendo significativamente ( $p < 0,05$ ) en el 12<sup>o</sup> mes en el bebé 5 (4,81 log ufc/g). Las bifidobacterias mostraron una clara tendencia a disminuir con la edad en los bebés alimentados con FC. Entre los alimentados con FP, los bebés 3 y 4 aumentaron el recuento a partir del 7<sup>o</sup> mes (6,94 y 8,14 log ufc/g, respectivamente) aunque en el caso del bebé 4 éste disminuyó al final (6,12 log ufc/g) de forma significativa ( $p < 0,05$ ). El bebé 5 mostró una recuperación significativa ( $p < 0,05$ ) del número de bifidobacterias en el 5<sup>o</sup> mes (8,84 log ufc/g) pero a partir del 7<sup>o</sup> mes el recuento disminuyó (8,12 log ufc/g) de forma significativa ( $p < 0,05$ ) con la edad.

Para resumir los resultados presentados en la Tabla 33, hay que destacar la falta de homogeneidad en los recuentos de bacteroides y clostridios entre los distintos bebés hayan o

no recibido la FP. En cuanto al recuento de bifidobacterias, mientras que los bebés alimentados con la FC éste disminuyó progresivamente con la edad, en los alimentados con la FP se observó una recuperación tras la administración de dicha fórmula, aunque al final del estudio los recuentos disminuyeran.

Los recuentos obtenidos de los diferentes microorganismos en el 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> mes de vida coinciden con otros recuentos encontrados en la bibliografía científica para esta edad tanto con alimentación con fórmula infantil (Lundequist y col., 1985; Kleessen y col., 1995) como con leche materna (Lundequist y col., 1985; Kleessen y col., 1995; Orrhage y Nord, 1999). Para los recuentos a partir del 5<sup>o</sup> mes apenas existen estudios sobre la composición de la microflora infantil a estas edades. Se han descrito recuentos de clostridios que oscilan de 4 a 5,5 y 5,8 log ufc/g heces para niños alimentados con leche materna a los seis y doce meses (Orrhage y Nord, 1999). Estos recuentos coinciden con los hallados por nosotros, así como también para los obtenidos en el caso de los bacteroides y las bifidobacterias al año de edad en el que se describen recuentos de 7 y 7,3 log ufc/g heces, respectivamente.

**Tabla 33.** Recuento microbiológico en muestras fecales infantiles a lo largo del 1<sup>er</sup> año de vida

| Tipo de fórmula<br>Microorganismo | Edad del bebé            |                         |                         |                         |                          |                         |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                                   | 1 mes                    | 3 meses                 | 5 meses                 | 7 meses                 | 9 meses                  | 12 meses                |
| <b>Control (bebé 1)</b>           |                          |                         |                         |                         |                          |                         |
| Anaerobios totales                | 7,76±0,04 <sup>ab</sup>  | 8,46±0,01 <sup>a</sup>  | 6,60±0,41 <sup>d</sup>  | 7,95±0,03 <sup>ab</sup> | 6,75±0,10 <sup>cd</sup>  | 7,48±0,00 <sup>bc</sup> |
| Bacteroides                       | 7,24±0,04 <sup>ab</sup>  | 7,36±0,05 <sup>a</sup>  | 7,16±0,05 <sup>bc</sup> | 7,17±0,03 <sup>bc</sup> | 7,05±0,02 <sup>c</sup>   | 6,45±0,02 <sup>d</sup>  |
| Bifidobacterias                   | 7,25±0,04 <sup>a</sup>   | 5,83±0,17 <sup>bc</sup> | 5,43±0,20 <sup>c</sup>  | 6,74±0,03 <sup>a</sup>  | 5,66±0,031 <sup>bc</sup> | 6,11±0,01 <sup>b</sup>  |
| Clostridios                       | 6,44±0,22 <sup>ab</sup>  | 6,45±0,04 <sup>ab</sup> | 6,79±0,01 <sup>a</sup>  | 6,04±0,02 <sup>b</sup>  | 3,84±0,07 <sup>c</sup>   | 6,80±0,27 <sup>a</sup>  |
| <b>Control (bebé 2)</b>           |                          |                         |                         |                         |                          |                         |
| Anaerobios totales                | 9,12±0,03 <sup>a</sup>   | 8,77±0,01 <sup>b</sup>  | 8,77±0,04 <sup>b</sup>  | 7,58±0,14 <sup>c</sup>  | 7,48±0,01 <sup>c</sup>   | 7,01±0,04 <sup>d</sup>  |
| Bacteroides                       | 6,91±0,43 <sup>ab</sup>  | 7,71±0,12 <sup>a</sup>  | 5,78±0,01 <sup>c</sup>  | 7,06±0,13 <sup>ab</sup> | 7,28±0,07 <sup>ab</sup>  | 6,57±0,03 <sup>bc</sup> |
| Bifidobacterias                   | 7,12±0,08 <sup>b</sup>   | 7,65±0,03 <sup>a</sup>  | 7,06±0,02 <sup>b</sup>  | 7,21±0,04 <sup>b</sup>  | 7,26±0,05 <sup>b</sup>   | 6,62±0,08 <sup>c</sup>  |
| Clostridios                       | 6,72±0,01 <sup>a</sup>   | 3,48±0,01 <sup>d</sup>  | 6,63±0,18 <sup>a</sup>  | 6,21±0,02 <sup>b</sup>  | 5,19±0,03 <sup>c</sup>   | 5,86±0,05 <sup>b</sup>  |
| <b>Probiótica (bebé 3)</b>        |                          |                         |                         |                         |                          |                         |
| Anaerobios totales                | 8,47±0,09 <sup>a</sup>   | 6,94±0,12 <sup>bc</sup> | 7,19±0,12 <sup>bc</sup> | 7,31±0,12 <sup>b</sup>  | 6,70±0,14 <sup>c</sup>   | 7,32±0,01 <sup>b</sup>  |
| Bacteroides                       | 6,71±0,08 <sup>a</sup>   | 6,57±0,10 <sup>a</sup>  | 6,71±0,04 <sup>a</sup>  | 6,52±0,16 <sup>a</sup>  | 5,78±0,01 <sup>b</sup>   | 6,84±0,08 <sup>a</sup>  |
| Bifidobacterias                   | 8,20±0,01 <sup>a</sup>   | 6,05±0,01 <sup>d</sup>  | 5,65±0,17 <sup>e</sup>  | 6,94±0,11 <sup>c</sup>  | 7,54±0,01 <sup>b</sup>   | 7,32±0,12 <sup>b</sup>  |
| Clostridios                       | 5,94±0,23 <sup>a</sup>   | 5,40±0,05 <sup>bc</sup> | 5,37±0,03 <sup>c</sup>  | 6,10±0,01 <sup>a</sup>  | 5,93±0,01 <sup>a</sup>   | 5,87±0,07 <sup>ab</sup> |
| <b>Probiótica (bebé 4)</b>        |                          |                         |                         |                         |                          |                         |
| Anaerobios totales                | 7,64±0,45 <sup>ab</sup>  | 6,71±0,08 <sup>b</sup>  | 8,49±0,06 <sup>a</sup>  | 8,25±0,01 <sup>a</sup>  | 7,91±0,16 <sup>a</sup>   | 6,75±0,17 <sup>b</sup>  |
| Bacteroides                       | 5,57±0,11 <sup>b</sup>   | 5,52±0,24 <sup>b</sup>  | 4,47±0,01 <sup>c</sup>  | 6,71±0,06 <sup>a</sup>  | 7,35±0,26 <sup>a</sup>   | 5,78±0,01 <sup>b</sup>  |
| Bifidobacterias                   | 8,82±0,13 <sup>a</sup>   | 7,65±0,32 <sup>b</sup>  | 7,58±0,11 <sup>b</sup>  | 8,14±0,06 <sup>ab</sup> | 8,14±0,18 <sup>ab</sup>  | 6,12±0,20 <sup>c</sup>  |
| Clostridios                       | 4,60±0,08 <sup>d</sup>   | 5,37±0,13 <sup>cd</sup> | 6,05±0,06 <sup>bc</sup> | 6,14±0,17 <sup>bc</sup> | 6,41±0,18 <sup>b</sup>   | 7,68±0,07 <sup>a</sup>  |
| <b>Probiótica (bebé 5)</b>        |                          |                         |                         |                         |                          |                         |
| Anaerobios totales                | 7,91±0,27 <sup>bc</sup>  | 7,64±0,14 <sup>bc</sup> | 8,86±0,08 <sup>a</sup>  | 8,22±0,08 <sup>ab</sup> | 8,20±0,09 <sup>ab</sup>  | 7,36±0,10 <sup>c</sup>  |
| Bacteroides                       | 7,51±0,23 <sup>ab</sup>  | 5,12±0,03 <sup>c</sup>  | 7,90±0,03 <sup>a</sup>  | 7,90±0,03 <sup>a</sup>  | 7,40±0,01 <sup>b</sup>   | 7,28±0,06 <sup>b</sup>  |
| Bifidobacterias                   | 7,85±0,27 <sup>bc</sup>  | 6,76±0,02 <sup>d</sup>  | 8,84±0,03 <sup>a</sup>  | 8,12±0,06 <sup>b</sup>  | 7,85±0,13 <sup>bc</sup>  | 7,38±0,05 <sup>c</sup>  |
| Clostridios                       | 5,03±0,16 <sup>abc</sup> | 5,47±0,02 <sup>a</sup>  | 5,24±0,04 <sup>ab</sup> | 4,71±0,04 <sup>c</sup>  | 5,35±0,15 <sup>a</sup>   | 4,81±0,11 <sup>bc</sup> |

Cada valor es la media del log ufc/g heces en peso húmedo±error típico, n=3

<sup>a-e</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma fila para cada bebé muestran diferencias significativas (p<0,001) para el recuento de cada microorganismo en las diferentes edades

En la **Tabla 34** se muestran los valores de pH medidos en las diferentes muestras fecales de los cinco bebés del presente estudio. La tendencia general es hacia un aumento del pH de las heces conforme los bebés avanzan en edad. De hecho en cuatro de los cinco bebés (bebés 1, 2, 4 y 5) el valor de pH más elevado se encontró en la muestra correspondiente al año de edad. Los valores más bajos de pH se mostraron en todos los bebés, excepto el bebé 4, dentro de los tres primeros meses.

El hecho de que las heces de los niños alimentados a pecho tengan un menor pH que los alimentados con fórmula infantil ha sido observado en varios estudios (Balmer y col., 1989; Kleessen y col., 1995; Langhendries y col., 1995). Se ha sugerido que el elevado contenido en lactosa, y bajo contenido en proteínas y fosfatos de la leche materna podrían actuar como factores bifidogénicos (Yoshioka y col., 1983). Además su baja capacidad tamponadora favorece el crecimiento de las bifidobacterias, ya que la fermentación de la lactosa mantiene la acidez intestinal mediante la producción de ácido acético y ácido láctico (Yoshioka y col., 1983). En nuestro estudio, los bebés 1 y 5 fueron los que mostraron un pH significativamente ( $p < 0,001$ ) más reducido en la primera muestra debido a que fueron los únicos bebés que tomaron leche materna como único alimento durante el primer mes. Langhendries y col. (1995) también encontraron que al mes de edad, el grupo de bebés alimentados únicamente con leche materna presentó un pH significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajo (5,07) que el grupo alimentado con fórmula infantil a base de suero lácteo (5,52), pero no mostró diferencias con el pH de las heces del grupo cuya fórmula contenía *B. bifidum* (5,30), siendo las bifidobacterias la flora anaerobia predominante en los niños alimentados a pecho y con la fórmula probiótica. Kleessen y col. (1995) encontraron unos valores de pH más similares a los nuestros en un grupo de niños alimentados con leche materna o con fórmula infantil a base de suero lácteo al mes (6,22 y 6,99, respectivamente) y tres meses (5,82 y 7,22, respectivamente) de edad.

**Tabla 34.** Valor de pH de las muestras fecales infantiles a lo largo del 1<sup>er</sup> año de vida

| Tipo de fórmula            | Edad del bebé           |                         |                         |                         |                         |                         |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                            | 1 mes                   | 3 meses                 | 5 meses                 | 7 meses                 | 9 meses                 | 12 meses                |
| <b>Control (bebé 1)</b>    | 5,48±0,07 <sup>e</sup>  | 7,07±0,05 <sup>b</sup>  | 6,39±0,03 <sup>d</sup>  | 6,78±0,01 <sup>c</sup>  | 7,00±0,01 <sup>b</sup>  | 7,40±0,009 <sup>a</sup> |
| <b>Control (bebé 2)</b>    | 6,43±0,07 <sup>d</sup>  | 6,23±0,01 <sup>e</sup>  | 6,93±0,02 <sup>c</sup>  | 7,28±0,02 <sup>b</sup>  | 7,49±0,03 <sup>a</sup>  | 7,58±0,01 <sup>a</sup>  |
| <b>Probiótica (bebé 3)</b> | 6,96±0,03 <sup>d</sup>  | 7,15±0,01 <sup>c</sup>  | 6,34±0,03 <sup>e</sup>  | 7,87±0,01 <sup>a</sup>  | 7,72±0,01 <sup>b</sup>  | 7,21±0,02 <sup>c</sup>  |
| <b>Probiótica (bebé 4)</b> | 6,71±0,006 <sup>b</sup> | 5,98±0,003 <sup>d</sup> | 6,72±0,007 <sup>b</sup> | 6,39±0,006 <sup>c</sup> | 5,72±0,003 <sup>e</sup> | 7,64±0,006 <sup>a</sup> |
| <b>Probiótica (bebé 5)</b> | 5,58±0,05 <sup>e</sup>  | 7,18±0,005 <sup>b</sup> | 6,92±0,02 <sup>c</sup>  | 6,28±0,009 <sup>d</sup> | 7,18±0,01 <sup>b</sup>  | 8,02±0,009 <sup>a</sup> |

Cada valor es la media±error típico, n=3

<sup>a-e</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma fila muestran diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) para cada valor de pH en las diferentes edades

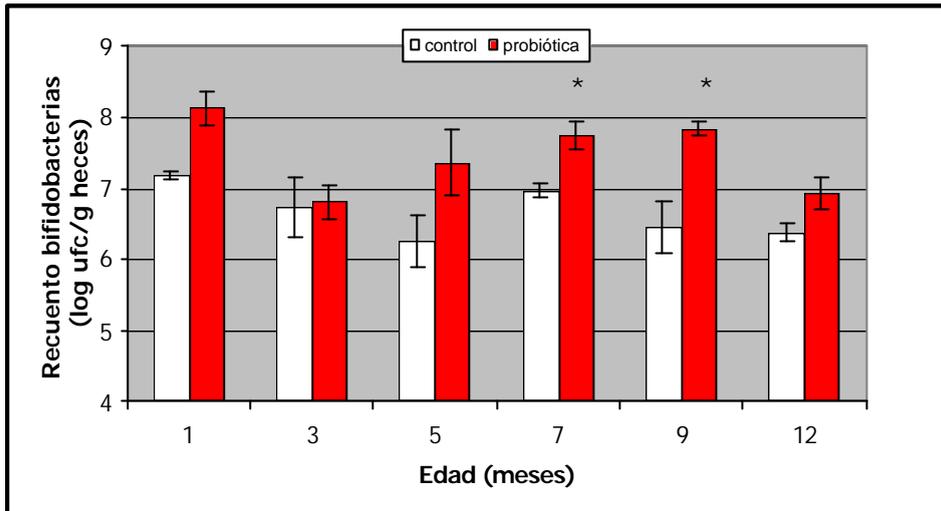
La **Tabla 35** muestra el análisis de varianza para observar las diferencias existentes entre los diferentes recuentos microbiológicos del grupo de bebés alimentados con FC (bebé 1 y 2) y del grupo alimentado con FP (bebés 3, 4 y 5) a diferentes edades durante el 1<sup>er</sup> año de vida. Los recuentos bacterianos mostraron una gran variabilidad hasta el 3<sup>er</sup> mes debido posiblemente al hecho de que la adquisición por el niño de un tipo de flora u otra está

fuertemente influenciado por la propia flora vaginal e intestinal de la madre, por el tipo de parto (vaginal o por cesárea) y el tipo de lactancia (materna o artificial) (Lundequist y col., 1985). Respecto a la influencia del parto, son de gran importancia las condiciones ambientales de la sala de maternidad y la higiene de las manos del personal médico y de enfermería durante el parto (Lundequist y col., 1985; Grönlund y col., 1999). A partir del 5º mes no se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los recuentos de anaerobios totales, bacteroides y bifidobacterias, aunque si lo fueron para los clostridios ( $p < 0,001$ ). Este hecho coincide con el inicio de la toma de la FP y de la alimentación complementaria, caracterizada ésta última por asemejar el perfil microbiológico entre los niños alimentados a pecho y los alimentados con fórmula (Stark y Lee, 1982), y por tanto ser la responsable de que los recuentos de anaerobios totales, bacteroides y clostridios (salvo el 9º mes) se mantengan sin diferencias entre ambos grupos hasta el año de edad. En el 7º y 9º mes ya se apreciaron diferencias en el recuento de las bifidobacterias entre el grupo alimentado con FP y el control. La diferencia se observa claramente en la **Figura 21** donde los recuentos de bifidobacterias en estos dos meses fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores en el grupo alimentado con FP. También se puede observar un significativo ( $p < 0,01$ ) mayor número de bifidobacterias en el 1º mes de edad en este mismo grupo debido posiblemente al efecto de la leche materna, puesto que a esa edad todavía no tomaban la FP. Por último como se puede observar en la **Tabla 35**, a los doce meses la similitud de los recuentos microbiológicos fecales entre ambos grupos afecta a todas las bacterias estudiadas, debido posiblemente a que la gran diversidad de alimentación que el niño toma a esa edad y a que el aporte de la FP a la dieta infantil se ve reducido considerablemente, promoviendo el desarrollo de una microflora intestinal con una mayor variedad de especies bacterianas (Stark y Lee, 1982).

**Tabla 35.** Análisis de varianza de los recuentos de la microbiota fecal infantil a diferentes edades entre los grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica

| Microorganismo            | Edad del bebé |         |         |         |         |          |
|---------------------------|---------------|---------|---------|---------|---------|----------|
|                           | 1 mes         | 3 meses | 5 meses | 7 meses | 9 meses | 12 meses |
| <b>Anaerobios totales</b> | NS            | ***     | NS      | NS      | NS      | NS       |
| <b>Bacteroides</b>        | NS            | ***     | NS      | NS      | NS      | NS       |
| <b>Bifidobacterias</b>    | **            | NS      | NS      | *       | ***     | NS       |
| <b>Clostridios</b>        | ***           | NS      | ***     | NS      | ***     | NS       |

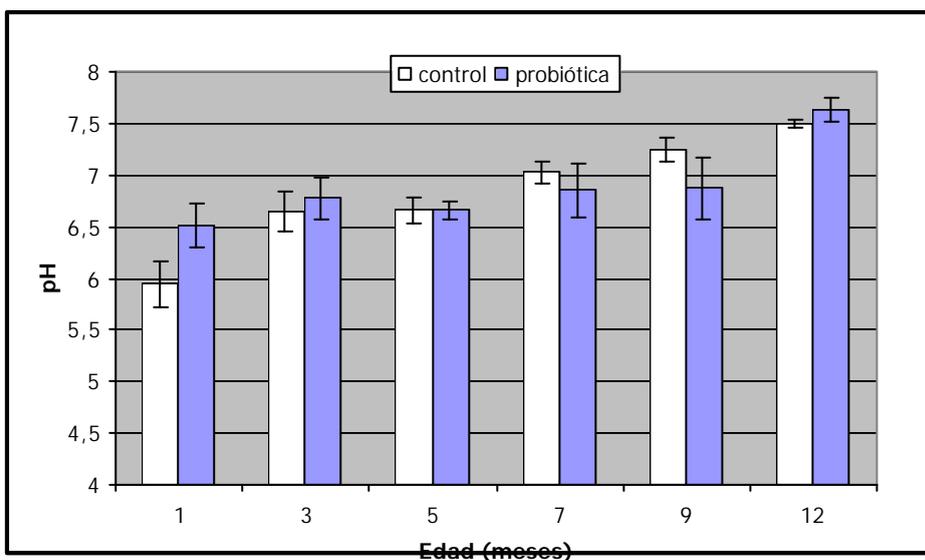
Diferencias significativas para: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; NS=no significación



**Figura 21.** Recuento de bifidobacterias en los grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica durante el 1<sup>er</sup> año de vida

\* La presencia de asteriscos indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los recuentos de bifidobacterias del mes 3 al 12 entre ambos grupos, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

En la **Figura 22** se representa el pH de las muestras fecales de los grupos alimentados con FC ó FP. Anteriormente se ha descrito que en varios estudios se observó un menor pH fecal en niños alimentados con leche materna y con fórmula probiótica respecto a los niños alimentados con fórmula infantil (Langhendries y col., 1995). Tal y como se muestra en la Figura 22, en nuestro estudio no existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el pH de las muestras fecales en ninguna edad, sin embargo, a los siete y nueve meses los valores de pH fueron menores en el grupo alimentado con FP respecto al alimentado con FC, edades en las que el recuento de bifidobacterias fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior en el grupo alimentado con FP.



**Figura 22.** pH de las heces infantiles en los grupos alimentados con fórmula control y fórmula probiótica durante el 1<sup>er</sup> año de vida

Tras realizar los recuentos microbiológicos de las bifidobacterias, se procedió al aislamiento de una colonia por muestra en cada uno de los periodos de muestreo con el fin de incubarla posteriormente en la galería api 50 CHL y obtener un perfil bioquímico que permita su caracterización. Previamente, estas colonias fueron estudiadas al microscopio, apreciándose que todas ellas fueron gram-positivas y con una morfología pleomórfica.

El patrón de fermentación de las bifidobacterias aisladas de las muestras fecales infantiles se muestra en la **Tabla 36**. Se observa que en todas las muestras se repite un patrón de fermentación muy similar por lo que no se puede asegurar que las bacterias probióticas afecten de forma definitiva a las bifidobacterias fecales. Además, en casi todos los casos las colonias no fermentaron el substrato rafinosa, que fue la fuente de carbono empleada en el medio de cultivo Raffinose-Bifidobacterium (RB) utilizado en el recuento y aislamiento de las bifidobacterias fecales. Moreno y col. (2000) tampoco encontraron que la galería api 50CHL resultara del todo reproducible al 100% en la identificación de las bifidobacterias en productos lácteos, y concluyeron que para estas bacterias no se encontró ninguna batería de pruebas bioquímicas que diferencien claramente este género, a pesar de que otros autores consideran este sistema adecuado (Shin y col., 200b).

Como conclusión en esta fase, podemos afirmar que las bacterias *B. bifidum* y *B. longum* presentes en la fórmula infantil estudiada mostraron unos recuentos por encima de  $10^6$  ufc/g durante los catorce días de consumo del producto. Sin embargo, cuando ésta fue administrada a un grupo de bebés desde el 4º hasta el 12º mes de edad, únicamente se obtuvo un recuento de bifidobacterias fecales significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al del grupo alimentado con fórmula control a la edad de siete y nueve meses, sin mostrar diferencias ni en el 5º mes, debido probablemente a que era demasiado pronto para observar algún efecto, ni en el 12º mes por la escasa aportación cuantitativa de la fórmula probiótica a la dieta del niño a esa edad. Además, el patrón de fermentación de azúcares (api 50 CHL) mostrado por las bifidobacterias fecales no indicó ningún cambio en la composición de esta especie bacteriana tras la administración de la fórmula probiótica.

|         |                          | api 50 CHL |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|---------|--------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|
| Muestra |                          | 1.1        | 1.3 | 1.5 | 1.7 | 1.9 | 1.12 | 2.1 | 2.3 | 2.5 | 2.7 | 2.9 | 2.12 | 3.1 | 3.3 | 3.5 | 3.7 | 3.9 | 3.12 | 4.1 | 4.3 | 4.5 | 4.7 | 4.9 | 4.12 | 5.1 | 5.3 | 5.5 | 5.7 | 5.9 | 5.12 |  |  |
|         | 49. 5-Keio-gluconato     |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 48. 2-Keio-gluconato     |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 47. Gluconato            |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 46. L-Arabitol           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 45. D-Arabitol           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 44. L-Fucosa             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 43. D-Fucosa             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 42. D-Tagatosa           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 41. D-Lixosa             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 40. D-Turanosa           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 39. 2-Gentioibiosa       |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 38. Xilitol              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 37. Glucogeno            |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 36. Almidón              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 35. D-Rafinosa           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 34. Melezitosa           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 33. Inulina              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 32. Trealosa             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 31. Sacarosa             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 30. Melobiosa            |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 29. Lactosa              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 28. Maltosa              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 27. Celobiosa            |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 26. Salicina             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 25. Esculina             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 24. Arbutina             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 23. Amigdalina           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 22. N-Acetil-glucosamina |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 21. L-Metil-D-glucosido  |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 20. L-Metil-D-manosido   |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 19. Sorbitol             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 18. Manitol              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 17. Inositol             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 16. Dulcitol             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 15. Ramnosa              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 14. L-Sorposa            |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 13. D-Manosa             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 12. D-Fructosa           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 11. D-Glucosa            |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 10. Galactosa            |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 9. 2-Metil-xilósido      |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 8. Adonitol              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 7. L-Xilosa              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 6. D-Xilosa              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 5. Ribosa                |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 4. L-Arabinosa           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 3. D-Arabinosa           |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 2. Eritritol             |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |
|         | 1. Glicerol              |            |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |      |  |  |

**Tabla 36.** Patrón de fermentación de las bifidobacterias aisladas de las muestras fecales infantiles mediante la galería api 50CH. Los resultados se muestran por bebé (1, 2, 3, 4 y 5) y periodo de muestreo (1, 3, 5, 7, 9 y 12).

### 3<sup>er</sup> ESTUDIO

#### 4. Estudio *in vivo* con ratas del efecto de los probióticos, prebióticos y simbióticos en fórmulas infantiles sobre la absorción mineral

Los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* del primer estudio del presente trabajo nos llevaron a la elección de 4'-GOS como prebiótico para ser añadido tanto a una fórmula infantil normal como a una fórmula probiótica (*B. bifidum* y *B. longum*) a la concentración de 1,2, 5 y 10%. De tal forma que fueron elaboradas un total de siete dietas problema denominadas dieta probiótica, prebióticas (1,2, 5 y 10%) y simbióticas (1,2, 5 y 10%) empleando la fórmula infantil como control y una dieta de mantenimiento (dieta AO4) como referencia del normal desarrollo de los animales. El objetivo principal de este tercer estudio fue evaluar el efecto de los probióticos y prebióticos, tanto de forma individual como conjunta (simbióticos) añadidos a las fórmulas infantiles, sobre la absorción mineral mediante la administración de las dietas anteriores en ratas recién destetadas durante 30 días.

Los estudios en bebés son muy limitados por razones éticas y de metodología, por lo que en su sustitución se emplean las técnicas *in vitro* en las que se simulan las condiciones fisiológicas del organismo destino del estudio. Una alternativa son los estudios *in vivo* empleando crías de rata como un modelo infantil animal para la evaluación de la disponibilidad mineral en fórmulas infantiles (Lönnnerdal y col., 1993, 1994). En este trabajo fueron empleados animales separados de sus madres a las tres semanas de edad ya que todavía son lactantes y constituyen un mejor modelo que la rata adulta. Para Sarriá y col. (2001) es razonable y lógico que se usen las crías con una dieta a base de leche y presumiblemente tengan una fisiología gastrointestinal con mayor similitud a la del niño.

##### 4.1. Efecto sobre las medidas fisiológicas y tasa de crecimiento de las ratas

Durante el estudio fueron medidos distintos parámetros fisiológicos en los animales, tales como el peso corporal, la ganancia de peso, la toma de alimento y agua, y la excreción de heces y orina, con el fin de evaluar posibles diferencias en la fisiología de las ratas como consecuencia del consumo de una u otra dieta.

La **Tabla 37** muestra el análisis de varianza realizado a los parámetros medidos en los animales para evaluar el crecimiento de los mismos como son el *peso corporal final*, la *ganancia de peso* y la *ingestión total de alimento*, así como la *eficiencia alimentaria* obtenida tras el consumo de las distintas dietas utilizadas. Tal y como se muestra todos estos parámetros se vieron significativamente ( $p < 0,001$ ) afectados por el consumo de una u otra dieta.

**Tabla 37.** Análisis de varianza de los parámetros peso final, ganancia de peso, ingestión de alimento y eficiencia alimentaria debido a las dietas objeto de estudio, y estudio del efecto del peso inicial de los animales en la variación de estos parámetros

| Variable                    | ANOVA | MANCOVA<br>covariable: peso inicial |
|-----------------------------|-------|-------------------------------------|
| Peso final                  | ***   | ***                                 |
| Ganancia de peso            | ***   | NS                                  |
| Ingestión total de alimento | ***   | **                                  |
| Eficiencia alimentaria      | ***   | NS                                  |

Diferencias significativas para: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; NS=no significación

Para la discusión de los resultados y el análisis estadístico de los datos obtenidos se ha prescindido del primer grupo (alimentado con la dieta AO4), ya que la alimentación de este grupo consistió en un tipo de dieta distinto al empleado con el resto de grupos. Dicho grupo (alimentado con una dieta específica para ratas de laboratorio) se utilizó como referencia para monitorizar el crecimiento de los animales alimentados con las fórmulas infantiles problema. De todas formas, los resultados obtenidos con este grupo también se muestran en las diferentes tablas con el fin de apreciar de un modo más nítido las diferencias existentes con el resto de grupos.

En la **Tabla 38** se muestran los parámetros relacionados con el crecimiento y la eficiencia alimentaria de las ratas alimentadas con las nueve dietas experimentales. Tal y como se puede observar el peso de los animales al inicio del estudio difirió significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes grupos. Los grupos con animales de mayor peso fueron los grupos con las dietas AO4 y control (89,37 y 72,67 g, respectivamente), oscilando el peso para los restantes grupos entre 36,32 y 55,93 g (grupos alimentados con las dietas simbióticas al 1,2 y 10%, respectivamente). Como era previsible, al final del estudio los animales de los grupos con las dietas AO4 y control fueron los que presentaron un mayor peso corporal (321,77 y 217,40 g, respectivamente), y el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% el que presentó un menor peso final (81,30 g). Los pesos finales de los animales alimentados con las dietas probiótica, prebiótica al 1,2% y simbiótica al 5 y 10% no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Al igual que con el peso corporal inicial y final, los parámetros de ganancia de peso e ingestión total de alimento fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores en el grupo alimentado con la dieta AO4 (232,40 y 695,12 g, respectivamente) respecto a los grupos alimentados con las dietas problema y control. El único grupo que no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en ninguno de los dos parámetros con el grupo control (144,73 y 298,53 g, respectivamente) fue el alimentado con la dieta prebiótica al 5% (130,08 y 262,98 g, respectivamente), y de nuevo los grupos que mostraron los valores significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajos fueron los alimentados con las dietas simbiótica la 1,2% (81,30 y 175,21 g, respectivamente) y 5% (90,77 y 206,28 g, respectivamente).

Con los valores obtenidos de la ganancia de peso corporal durante los treinta días del estudio y la ingestión total de alimento durante dicho periodo, se calculó la eficiencia alimentaria (relación del primero entre el segundo) con el fin de establecer si la diferencia de

peso observada entre los diferentes grupos suponía un menor aprovechamiento nutricional del alimento por parte de los grupos que partían con un menor peso inicial. Tal y como se observa, todos los grupos alimentados con fórmula infantil presentaron una mayor eficiencia alimentaria ( $\geq 0,44$ ) respecto al primer grupo, alimentado con la dieta AO4 (0,33). La eficiencia alimentaria nos permite evidenciar un posible retraso en el crecimiento o una carencia nutricional apreciable físicamente en los animales alimentados con una fórmula infantil para lactantes humanos. Los resultados por tanto muestran que ninguna de las ratas alimentadas con las diferentes variantes de dicha dieta presentó el menor signo de carencia nutricional durante el estudio, y que el aporte proteico de la misma era de mayor calidad que la dieta administrada a las ratas del primer grupo. Ninguno de los siete grupos alimentados con alguna de las dietas experimentales mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con el grupo control alimentado con la fórmula infantil utilizada como base.

**Tabla 38.** Crecimiento y eficiencia alimentaria

| Dieta           | Peso inicial<br>(g)     | Peso final<br>(g)         | Ganancia de<br>peso (g)    | Ingestión total<br>de alimento (g) | Eficiencia<br>alimentaria |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| AO4             | 89,37±0,54 <sup>a</sup> | 321,77±7,27 <sup>a</sup>  | 232,40±7,09 <sup>a</sup>   | 695,12±12,04 <sup>a</sup>          | 0,33±0,01 <sup>c</sup>    |
| Control         | 72,67±2,50 <sup>b</sup> | 217,40±8,44 <sup>b</sup>  | 144,73±6,35 <sup>b</sup>   | 298,53±12,70 <sup>b</sup>          | 0,48±0,01 <sup>ab</sup>   |
| Probiótica      | 42,68±0,83 <sup>d</sup> | 154,88±2,53 <sup>de</sup> | 112,20±2,15 <sup>ce</sup>  | 223,36±6,46 <sup>d</sup>           | 0,50±0,02 <sup>a</sup>    |
| Prebiótica 1,2% | 42,77±1,22 <sup>d</sup> | 164,17±3,38 <sup>ce</sup> | 121,40±2,67 <sup>cd</sup>  | 239,29±5,48 <sup>cd</sup>          | 0,51±0,01 <sup>a</sup>    |
| Prebiótica 5%   | 52,02±0,63 <sup>c</sup> | 182,10±2,72 <sup>c</sup>  | 130,08±2,49 <sup>bc</sup>  | 262,98±2,99 <sup>bc</sup>          | 0,49±0,01 <sup>a</sup>    |
| Prebiótica 10%  | 55,73±0,52 <sup>c</sup> | 176,05±4,12 <sup>cd</sup> | 120,32±4,11 <sup>cd</sup>  | 255,62±5,20 <sup>cd</sup>          | 0,47±0,01 <sup>ab</sup>   |
| Simbiótica 1,2% | 36,32±2,57 <sup>e</sup> | 117,62±5,23 <sup>f</sup>  | 81,30±4,75 <sup>g</sup>    | 175,21±6,25 <sup>f</sup>           | 0,46±0,01 <sup>ab</sup>   |
| Simbiótica 5%   | 51,93±0,36 <sup>c</sup> | 142,70±3,57 <sup>e</sup>  | 90,77±3,54 <sup>fg</sup>   | 206,28±7,67 <sup>ef</sup>          | 0,44±0,01 <sup>b</sup>    |
| Simbiótica 10%  | 55,93±0,99 <sup>c</sup> | 165,08±4,76 <sup>ce</sup> | 109,15±4,50 <sup>def</sup> | 234,15±8,29 <sup>cde</sup>         | 0,46±0,01 <sup>ab</sup>   |

Cada valor es la media±error típico, n=6

<sup>a-g</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna muestran diferencias significativas para  $p < 0,05$

Metodológicamente resulta complejo la selección de animales de experimentación a edades tempranas con pesos iniciales idénticos, debido a que entre otros factores es necesario cubrir al mismo tiempo a un número de hembras elevado para que la cantidad total de crías resultante en cada camada sea suficiente, añadiendo además a este hecho el tiempo necesario (21 días) hasta su destete. Parece lógico pensar que al partir de animales con diferentes pesos iniciales, los resultados obtenidos para el resto de variables que miden el crecimiento y la eficiencia alimentaria, estuvieran determinados por aquellos, y ser de esta manera un factor determinante a la hora de comparar otros parámetros fisiológicos de este estudio. Con el fin de validar los resultados obtenidos, y que comparativamente se puedan obtener conclusiones fiables cuando se enfrenten los resultados obtenidos de los diferentes grupos de ratas, se realizó un estudio de la covarianza multivariante (MANCOVA). Tal y como se muestra en la Tabla 37, el análisis realizado sobre las variables *peso corporal final*, *ganancia de peso*, *ingestión total de alimento* y *eficiencia alimentaria* reveló que no existieron diferencias para la ganancia de peso y la eficiencia alimentaria cuando se utilizó como covariable el peso inicial en

las ratas empleadas en el estudio, controlando de esta manera el influjo que esta variable tuvo sobre el resto.

La eficiencia alimentaria encontrada en nuestro estudio es similar a la mostrada en otros estudios (eficiencia alimentaria de 44) realizados con ratas de cuatro y cinco semanas de edad alimentadas con dietas enriquecidas con 5 y 10% GOS durante diez y siete días (Chonan y Watanuki, 1995; Chonan y Takahashi, 1999).

La **Tabla 39** muestra las diferentes medidas fisiológicas tomadas en los animales durante los tres periodos de tres días en los que las ratas fueron sometidas a un balance mineral y estuvieron controladas en jaulas metabólicas. En la tabla anterior se puede observar como entre los grupos problema, los que mostraron un mayor peso corporal inicial fueron los alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 5 y 10% (entre 51,93 y 55,93 g). Sin embargo como se observa en la Tabla 39, en el 1<sup>er</sup> periodo (8-10 días) el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 5% presentó un peso significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior (74,93 g) respecto a los otros tres (grupos alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% y simbiótica al 10%), y en el 2<sup>o</sup> (18-20 días) y 3<sup>er</sup> periodo (28-30 días) los grupos con un mayor peso corporal fueron los alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% (121,65 y 118,47 g; 177,09 y 170,78 g, respectivamente). Por el contrario, desde el inicio y hasta el último día de estudio el grupo alimentado con una dieta simbiótica al 1,2% presentó en todo momento el menor peso corporal (de 36,32 g a 113,57 g).

En cuanto a la ingestión de alimento, en el 1<sup>er</sup> periodo ningún grupo excepto el alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% (4,67 g/día) mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo control (6,05 g/día). En el 2<sup>o</sup> periodo todos mostraron una ingestión de alimento significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al grupo control (10,42 g/día). En el 3<sup>er</sup> periodo únicamente los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% (12,59 y 12,73 g/día, respectivamente) no mostraron diferencias con el grupo control (13,07 g/día), siendo además los que ingirieron una mayor cantidad de alimento a lo largo de todo el estudio entre los grupos problema. Estas diferencias en el consumo de las dietas se podrían deber a la diferencia de peso entre los animales ya que los que presentaron un mayor peso fueron los que ingirieron más alimento.

El consumo de 4'-GOS está condicionado por el consumo de alimento. En este sentido se observa que en los grupos prebióticos y simbióticos a las concentraciones de 1,2 y 5%, la ingestión de 4'-GOS fue menor en los grupos alimentados con las dietas simbióticas que en los alimentados con las prebióticas, debido al menor consumo de alimento de las ratas alimentadas con las dietas simbióticas. Por el contrario los grupos alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 10% presentaron la misma cantidad de 4'-GOS ingerida durante los tres periodos.

En el 1<sup>er</sup> periodo los únicos grupos que mostraron niveles significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores de ingestión de agua respecto al grupo control (9,83 mL/día) fueron los alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 10% (11,53 y 12,03 mL/día, respectivamente), que son los que tienen una mayor concentración de 4'-GOS. En el 2<sup>o</sup> periodo éstos mismos grupos

fueron los únicos que no mostraron diferencias con el grupo control (13,33 mL/día), siendo la ingestión de agua de los mismos superior al resto de los grupos. En el 3<sup>er</sup> periodo, todos los grupos mostraron valores similares al grupo control (15,89 mL/día) excepto los alimentados con las dietas simbióticas al 1,2 y 5% con valores significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores (11,00 y 12,44 mL/día, respectivamente). En cuanto al volumen de orina excretado, en el 1<sup>er</sup> periodo se observó que en los animales alimentados con la dieta probiótica y las dietas simbióticas al 1,2 y 5% (1,96, 1,29 y 1,46, respectivamente) excretaron un volumen de orina significativamente inferior respecto al grupo control (3,23 mL/día). En el 2<sup>o</sup> periodo, los grupos con las dietas prebiótica y simbiótica con la máxima concentración de 4'-GOS (3,44 y 3,66 mL/día, respectivamente) fueron los únicos que no mostraron diferencias con el grupo control (3,32 mL/día), con un volumen de orina estadísticamente ( $p < 0,05$ ) superior al resto de los grupos. En el 3<sup>er</sup> periodo, todos los grupos problema mostraron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores al grupo control (5,31 mL/día) y los grupos alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 10% (4,06 y 4,18 mL/día, respectivamente) fueron los que excretaron un mayor volumen de orina. Por tanto, se puede concluir que la adición de un 10% de 4'-GOS a las dietas provocó en las ratas una mayor ingestión de agua y como consecuencia una mayor excreción urinaria respecto a los grupos con menor concentración (1,2 y 5%).

En cuanto al volumen de heces excretadas (expresado en peso fresco), se aprecia que el volumen de heces de las ratas alimentadas con la dieta AO4 fue muy superior en los tres periodos (doce, ocho y seis veces mayor, respectivamente) respecto al de las ratas alimentadas con la fórmula infantil. En el 1<sup>er</sup> periodo, únicamente el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% (0,22 g/día) presentó un volumen significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior respecto al grupo control (0,69 g/día). En el 2<sup>o</sup> periodo, todos los grupos mostraron un volumen de heces significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al grupo control (1,32 g/día), hecho que puede atribuirse al periodo de adaptación intestinal a los probióticos y prebióticos, ya que en el 3<sup>er</sup> periodo, únicamente los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 10% y simbiótica al 1,2% (0,99 y 1,10 g/día, respectivamente) mostraron una cantidad de heces excretadas significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al grupo control (1,96 g/día).

Por último, en esta misma tabla (Tabla 39) se muestra el porcentaje de humedad de las heces excretadas. En el 1<sup>er</sup> periodo, únicamente el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 1,2% (47,64%) no presentó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (47,42%), el resto de grupos mostraron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores, y de ellos los grupos alimentados con las dietas simbióticas fueron los que tuvieron unas heces menos acuosas (de 20,42 a 25,96% de humedad). En el 2<sup>o</sup> periodo, el grupo alimentado con la dieta probiótica (47,78%) mostró una humedad superior al resto de grupos (incluido el control), y los grupos con una menor humedad fueron los alimentados con las dietas prebiótica al 1,2 y 10%, y simbiótica al 1,2% (35,10, 30,45 y 33,64%, respectivamente). En el 3<sup>er</sup> periodo, sólo el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 10% mostró una humedad (38,16%) significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior respecto al grupo control (50,33%). Por tanto, el contenido acuoso de las

heces disminuyó cuando se alimentó a las ratas con una fórmula infantil, y además esta disminución fue significativa ( $p < 0,05$ ) en los tres periodos cuando se añadieron 4'-GOS al 10% (dieta prebiótica al 10%).

Un efecto conocido de la fibra dietética insoluble y de ciertos OND es el aumento del volumen fecal (Cummings y col. 1992; Gibson y col., 1995; Roberfroid y col., 1993). Sin embargo, nosotros no observamos este efecto cuando se suministró 4'-GOS a la dieta. Diferentes estudios con ratas tampoco han encontrado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el peso seco de las heces con el grupo control cuando los animales fueron alimentados con un 5% de 4'-GOS durante siete días (Chonan y col., 2001), con un 5% de FOS cc, nistosa, inulina o goma guar durante seis semanas (Tashiro y col., 1997; Ohta y col., 1994b). En nuestro estudio la fórmula infantil, sin fibra en su composición, empleada como base de la dieta a la que se le añadió 4'-GOS, posiblemente podría ser la causa de la diferencia de peso en las heces encontrada entre los grupos alimentados con la fórmula y los alimentados con la dieta AO4, que presentó un 18,5% de fibra en su composición (Tabla 27 de la sección de Material y Métodos).

#### **4.2. Parámetros hematológicos y bioquímicos en las ratas**

Tras el sacrificio de los animales el día treinta de estudio, se realizó un análisis sanguíneo con los parámetros hematológicos y bioquímicos con el fin de completar la evaluación de estado fisiológico y nutricional de las ratas alimentadas con dietas diferentes a la indicada para su normal desarrollo durante las primeras semanas de vida (dieta AO4), y que ya se inició con la medición de las variables de crecimiento y eficiencia alimentaria descritas anteriormente.

En la **Tabla 40** se muestran los valores obtenidos al final del estudio para los siguientes parámetros: hemoglobina (Hb), recuento de glóbulos rojos (RGR), hematocrito (Ht), Fe sérico, TIBC (capacidad total de fijación del hierro), albúmina y urea séricas, así como los parámetros lipídicos triglicéridos (TG) sanguíneos, colesterol total (COL total) y sus fracciones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Como se puede observar, los niveles de Hb, RGR y Ht en los grupos alimentados con fórmula infantil no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el grupo de referencia (AO4), indicando así que el consumo de las dietas empleadas en el presente estudio no provocó anemia ni afectó al normal desarrollo de los animales. Los parámetros bioquímicos de Fe sérico, TIBC, albúmina y urea tampoco mostraron grandes diferencias entre los grupos problema con el grupo control, excepto en el alimentado con la dieta prebiótica al 10% que presentó un nivel de Fe sérico (438,75  $\mu\text{g/dL}$ ) significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control (240,50  $\mu\text{g/dL}$ ), y el alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% con un valor de albúmina (2,37  $\mu\text{g/dL}$ ) significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al grupo control (3,00  $\mu\text{g/dL}$ ).

**Tabla 39.** Medidas fisiológicas de las ratas

| Periodo    | Dietas          | Peso (g)                    | Ingestión alimento (g/día)  | Ingestión GOS (g/día)    | Ingestión agua (mL/día)    | Volumen orina (mL/día)    | Heces pf (g/día)         | Humedad heces (%)          |
|------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 8-10 días  | AO4             | 146,05±2,45                 | 20,29±0,74                  | 0,00±0,00                | 22,28±0,80                 | 4,50±0,35                 | 8,81±0,33                | 53,54±1,09                 |
|            | Control         | 102,32±2,62                 | 6,05±0,46                   | 0,00±0,00                | 9,83±0,50                  | 3,23±0,20                 | 0,69±0,14                | 47,42±0,89                 |
|            | Probiótica      | 70,05±1,11 <sup>*/c</sup>   | 5,85±0,13 <sup>b</sup>      | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 10,06±0,37 <sup>ab</sup>   | 1,96±0,10 <sup>*/b</sup>  | 0,47±0,12 <sup>a</sup>   | 40,35±0,19 <sup>*/b</sup>  |
|            | Prebiótica 1,2% | 72,98±1,33 <sup>*/c</sup>   | 5,87±0,27 <sup>b</sup>      | 0,07±0,00 <sup>*/d</sup> | 11,06±0,71 <sup>a</sup>    | 3,85±0,26 <sup>a</sup>    | 0,70±0,09 <sup>a</sup>   | 47,64±1,04 <sup>a</sup>    |
|            | Prebiótica 5%   | 83,65±0,89 <sup>*/a</sup>   | 6,87±0,15 <sup>a</sup>      | 0,34±0,01 <sup>*/b</sup> | 11,86±0,44 <sup>a</sup>    | 3,18±0,18 <sup>a</sup>    | 0,50±0,09 <sup>a</sup>   | 40,04±0,92 <sup>*/b</sup>  |
|            | Prebiótica 10%  | 83,98±1,10 <sup>*/a</sup>   | 5,91±0,23 <sup>b</sup>      | 0,59±0,02 <sup>*/a</sup> | 11,53±0,49 <sup>*/a</sup>  | 3,80±0,23 <sup>a</sup>    | 0,44±0,08 <sup>a</sup>   | 33,58±0,81 <sup>*/c</sup>  |
|            | Simbiótica 1,2% | 55,84±1,81 <sup>*/d</sup>   | 4,67±0,19 <sup>*/c</sup>    | 0,06±0,00 <sup>*/e</sup> | 8,22±0,27 <sup>b</sup>     | 1,29±0,09 <sup>*/c</sup>  | 0,22±0,04 <sup>*/a</sup> | 20,42±0,17 <sup>*/e</sup>  |
|            | Simbiótica 5%   | 74,93±1,11 <sup>*/c</sup>   | 5,26±0,32 <sup>bc</sup>     | 0,26±0,01 <sup>*/c</sup> | 8,89±0,43 <sup>b</sup>     | 1,46±0,12 <sup>*/bc</sup> | 0,36±0,09 <sup>a</sup>   | 24,03±0,25 <sup>*/d</sup>  |
|            | Simbiótica 10%  | 80,90±1,18 <sup>*/ab</sup>  | 5,87±0,16 <sup>b</sup>      | 0,59±0,01 <sup>*/a</sup> | 12,03±0,63 <sup>*/a</sup>  | 3,46±0,36 <sup>a</sup>    | 0,34±0,09 <sup>a</sup>   | 25,96±0,69 <sup>*/d</sup>  |
| 18-20 días | AO4             | 233,19±3,17                 | 25,66±0,35                  | 0,00±0,00                | 26,50±1,24                 | 7,13±0,29                 | 11,40±0,31               | 59,23±0,17                 |
|            | Control         | 148,11±3,66                 | 10,42±0,40                  | 0,00±0,00                | 13,33±0,55                 | 3,32±0,17                 | 1,32±0,11                | 43,48±1,68                 |
|            | Probiótica      | 105,03±1,01 <sup>*/de</sup> | 7,72±0,36 <sup>*/bc</sup>   | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 11,00±0,31 <sup>*/b</sup>  | 2,38±0,12 <sup>*/b</sup>  | 0,85±0,12 <sup>*/a</sup> | 47,78±1,10 <sup>*/a</sup>  |
|            | Prebiótica 1,2% | 109,37±1,31 <sup>*/cd</sup> | 8,50±0,19 <sup>*/ab</sup>   | 0,10±0,00 <sup>*/d</sup> | 10,83±0,53 <sup>*/bc</sup> | 2,16±0,12 <sup>*/b</sup>  | 0,51±0,06 <sup>*/a</sup> | 35,10±2,06 <sup>bc</sup>   |
|            | Prebiótica 5%   | 121,65±1,28 <sup>*/a</sup>  | 8,81±0,31 <sup>*/ab</sup>   | 0,44±0,01 <sup>*/b</sup> | 11,33±0,37 <sup>*/b</sup>  | 2,32±0,08 <sup>*/b</sup>  | 0,74±0,08 <sup>*/a</sup> | 41,74±1,02 <sup>b</sup>    |
|            | Prebiótica 10%  | 118,47±1,65 <sup>*/ab</sup> | 8,92±0,33 <sup>*/a</sup>    | 0,89±0,03 <sup>*/a</sup> | 11,72±0,71 <sup>b</sup>    | 3,44±0,23 <sup>a</sup>    | 0,45±0,09 <sup>*/a</sup> | 30,45±0,91 <sup>*/c</sup>  |
|            | Simbiótica 1,2% | 79,06±2,26 <sup>*/f</sup>   | 6,22±0,18 <sup>*/d</sup>    | 0,07±0,00 <sup>*/e</sup> | 8,94±0,37 <sup>*/c</sup>   | 1,06±0,12 <sup>*/c</sup>  | 0,55±0,10 <sup>*/a</sup> | 33,64±2,69 <sup>*/bc</sup> |
|            | Simbiótica 5%   | 100,27±1,23 <sup>*/e</sup>  | 7,01±0,21 <sup>*/cd</sup>   | 0,35±0,01 <sup>*/c</sup> | 9,72±0,36 <sup>*/bc</sup>  | 1,28±0,13 <sup>*/c</sup>  | 0,71±0,14 <sup>*/a</sup> | 37,06±1,57 <sup>*/b</sup>  |
|            | Simbiótica 10%  | 114,91±1,87 <sup>*/bc</sup> | 8,76±0,33 <sup>*/ab</sup>   | 0,87±0,03 <sup>*/a</sup> | 14,41±0,54 <sup>a</sup>    | 3,66±0,29 <sup>a</sup>    | 0,67±0,08 <sup>*/a</sup> | 39,38±1,89 <sup>b</sup>    |
| 28-30 días | AO4             | 317,29±3,94                 | 27,92±0,77                  | 0,00±0,00                | 31,78±1,73                 | 8,45±0,42                 | 11,97±0,63               | 54,54±0,12                 |
|            | Control         | 209,87±4,50                 | 13,07±0,48                  | 0,00±0,00                | 15,89±0,95                 | 5,31±0,47                 | 1,96±0,13                | 50,33±1,50                 |
|            | Probiótica      | 150,50±1,34 <sup>*/c</sup>  | 10,43±0,65 <sup>*/c</sup>   | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 14,67±0,50 <sup>a</sup>    | 2,89±0,20 <sup>*/bc</sup> | 1,59±0,23 <sup>a</sup>   | 52,38±2,15 <sup>ac</sup>   |
|            | Prebiótica 1,2% | 159,04±2,03 <sup>*/bc</sup> | 11,00±0,43 <sup>*/abc</sup> | 0,13±0,01 <sup>*/d</sup> | 13,83±0,93 <sup>abc</sup>  | 3,60±0,23 <sup>*/ab</sup> | 1,31±0,21 <sup>a</sup>   | 57,70±1,24 <sup>a</sup>    |
|            | Prebiótica 5%   | 177,09±1,77 <sup>*/a</sup>  | 12,59±0,25 <sup>ab</sup>    | 0,63±0,01 <sup>*/b</sup> | 15,89±0,35 <sup>a</sup>    | 3,41±0,19 <sup>*/ab</sup> | 1,39±0,13 <sup>a</sup>   | 44,29±1,79 <sup>cd</sup>   |
|            | Prebiótica 10%  | 170,78±2,24 <sup>*/a</sup>  | 12,73±0,30 <sup>a</sup>     | 1,27±0,03 <sup>*/a</sup> | 15,50±0,50 <sup>a</sup>    | 4,06±0,27 <sup>*/a</sup>  | 0,99±0,16 <sup>*/a</sup> | 38,16±2,03 <sup>*/d</sup>  |
|            | Simbiótica 1,2% | 113,57±2,82 <sup>*/e</sup>  | 8,11±0,29 <sup>*/d</sup>    | 0,09±0,00 <sup>*/e</sup> | 11,00±0,63 <sup>*/c</sup>  | 2,09±0,12 <sup>*/c</sup>  | 1,10±0,11 <sup>*/a</sup> | 46,62±2,35 <sup>bcd</sup>  |
|            | Simbiótica 5%   | 139,66±2,16 <sup>*/d</sup>  | 10,23±0,46 <sup>*/c</sup>   | 0,51±0,02 <sup>*/c</sup> | 12,44±0,34 <sup>*/bc</sup> | 2,83±0,34 <sup>*/bc</sup> | 1,71±0,26 <sup>a</sup>   | 48,52±2,75 <sup>abcd</sup> |
|            | Simbiótica 10%  | 160,76±2,60 <sup>*/b</sup>  | 10,73±0,52 <sup>*/bc</sup>  | 1,07±0,05 <sup>*/a</sup> | 13,97±0,51 <sup>ab</sup>   | 4,18±0,29 <sup>*/a</sup>  | 1,90±0,23 <sup>a</sup>   | 53,06±1,81 <sup>ab</sup>   |

Cada valor es la media ± error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-f</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos, indican diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica; <sup>q</sup> pf, peso fresco

En cuanto al contenido de COL total en sangre, aunque todos los grupos problema, excepto el alimentado con dieta probiótica, presentaron valores ligeramente inferiores al grupo control (78,70 mg/dL), únicamente alimentado con la dieta prebiótica al 1,2% mostró un valor significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior (65,23 mg/dL) al del grupo control. Al analizar los valores encontrados para la fracción VLDL, se observa que todos los grupos problema tuvieron un valor inferior al grupo control (29,88 mg/dL) pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Con la fracción HDL del COL tampoco se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos problema con el grupo control (48,84 mg/dL), mostrando los valores más elevados los grupos alimentados con la dieta probiótica y simbiótica al 10% (54,52 y 52,85 mg/dL, respectivamente). Es en el nivel de TG en sangre donde encontramos un claro y significativo ( $p < 0,05$ ) efecto de reducción de sus niveles en todos los grupos problema (de 49,83 mg/dL con la dieta simbiótica al 10% a 75,63 mg/dL con la dieta probiótica) con respecto al grupo control (97,25 mg/dL).

Por tanto se puede concluir que en nuestro caso la adicción de bifidobacterias y/o 4'-GOS tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en la reducción de los niveles de TG tras la administración de una dieta pro-, pre- y simbiótica durante treinta días. Nuestros resultados coinciden con los descritos por otros autores (Hata y col., 1983; Tokunaga y col., 1986) que emplearon como OND la oligofruktosa a la concentración de 5, 10 y 20%, y observaron un descenso significativo en los TG; sin embargo los niveles de COL no siempre fueron reducidos. Más recientemente, Kok y col. (1998b) han demostrado que el incremento postprandial de TG en ratas inducido por una dieta rica en grasas se redujo tras la administración de oligofruktosa.

**Tabla 40.** Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas alimentadas con diferentes dietas durante 30 días

| Dietas/Parámetros <sup>j</sup>               | AO4                     | Control                 | Probiótica                | Prebiótica<br>1,2%         | Prebiótica<br>5%           | Prebiótica<br>10%           | Simbiótica<br>1,2%         | Simbiótica<br>5%           | Simbiótica<br>10%          |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b>                    | 13,95±1,24 <sup>a</sup> | 14,82±1,31 <sup>a</sup> | 14,64±0,66 <sup>a</sup>   | 13,45±0,76 <sup>a</sup>    | 13,98±0,61 <sup>a</sup>    | 14,12±1,25 <sup>a</sup>     | 14,63±0,81 <sup>a</sup>    | 14,63±0,54 <sup>a</sup>    | 14,12±0,96 <sup>a</sup>    |
| <b>RGR (x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 6,86±0,79 <sup>a</sup>  | 6,64±2,11 <sup>a</sup>  | 6,44±0,13 <sup>a</sup>    | 7,19±1,13 <sup>a</sup>     | 7,85±2,64 <sup>a</sup>     | 6,51±0,54 <sup>a</sup>      | 6,50±0,35 <sup>a</sup>     | 6,44±0,31 <sup>a</sup>     | 6,74±0,41 <sup>a</sup>     |
| <b>Hematocrito (%)</b>                       | 44,40±4,27 <sup>a</sup> | 43,00±3,52 <sup>a</sup> | 44,00±1,86 <sup>a</sup>   | 48,53±4,18 <sup>a</sup>    | 47,80±2,21 <sup>a</sup>    | 43,03±3,66 <sup>a</sup>     | 44,25±2,76 <sup>a</sup>    | 44,92±2,94 <sup>a</sup>    | 45,70±1,52 <sup>a</sup>    |
| <b>Fe sérico (mg/dL)</b>                     | 238,50±52,92            | 240,50±18,17            | 277,25±24,96 <sup>b</sup> | 270,56±19,84 <sup>b</sup>  | 257,75±12,99 <sup>b</sup>  | 438,75±23,47 <sup>*/a</sup> | 332,50±39,00 <sup>ab</sup> | 353,75±25,46 <sup>ab</sup> | 265,25±46,05 <sup>b</sup>  |
| <b>TIBC (mg/dL)</b>                          | 345,25±32,32            | 324,50±14,79            | 272,00±7,53 <sup>b</sup>  | 351,33±23,48 <sup>ab</sup> | 407,75±29,47 <sup>a</sup>  | 360,50±28,72 <sup>ab</sup>  | 368,75±17,11 <sup>ab</sup> | 421,75±21,45 <sup>a</sup>  | 340,00±52,44 <sup>ab</sup> |
| <b>Albúmina (mg/dL)</b>                      | 3,27±0,13               | 3,00±0,00               | 3,02±0,11 <sup>a</sup>    | 2,95±0,11 <sup>ab</sup>    | 3,12±0,10 <sup>a</sup>     | 2,87±0,03 <sup>ab</sup>     | 2,37±0,16 <sup>*/b</sup>   | 2,92±0,10 <sup>ab</sup>    | 2,70±0,17 <sup>ab</sup>    |
| <b>Urea (mg/dL)</b>                          | 24,30±0,61              | 21,76±2,02              | 19,35±1,05 <sup>a</sup>   | 21,64±1,89 <sup>a</sup>    | 16,55±0,42 <sup>a</sup>    | 22,85±1,15 <sup>a</sup>     | 24,47±3,16 <sup>a</sup>    | 23,12±1,77 <sup>a</sup>    | 17,97±2,74 <sup>a</sup>    |
| <b>Colesterol total (mg/dL)</b>              | 69,42±3,59              | 78,70±4,20              | 82,10±1,88 <sup>a</sup>   | 65,23±1,12 <sup>*/b</sup>  | 75,46±1,36 <sup>ab</sup>   | 72,83±1,63 <sup>ab</sup>    | 75,33±5,22 <sup>ab</sup>   | 74,48±0,99 <sup>ab</sup>   | 74,86±1,85 <sup>ab</sup>   |
| <b>VLDL (mg/dL)</b>                          | 29,21±2,28              | 29,88±4,51              | 27,57±1,73 <sup>a</sup>   | 22,05±2,08 <sup>a</sup>    | 24,62±2,48 <sup>a</sup>    | 21,90±1,38 <sup>a</sup>     | 29,56±2,26 <sup>a</sup>    | 24,81±2,20 <sup>a</sup>    | 22,02±1,05 <sup>a</sup>    |
| <b>HDL (mg/dL)</b>                           | 40,21±2,20              | 48,84±0,62              | 54,52±1,88 <sup>a</sup>   | 43,15±1,66 <sup>a</sup>    | 50,78±3,08 <sup>a</sup>    | 50,93±2,28 <sup>a</sup>     | 45,77±3,87 <sup>a</sup>    | 49,67±1,63 <sup>a</sup>    | 52,85±1,61 <sup>a</sup>    |
| <b>Triglicéridos (mg/dL)</b>                 | 68,80±5,34              | 97,25±7,40              | 75,63±2,94 <sup>*/a</sup> | 55,33±3,32 <sup>*/b</sup>  | 60,46±3,74 <sup>*/ab</sup> | 53,73±2,10 <sup>*/a</sup>   | 53,75±4,81 <sup>*/a</sup>  | 53,00±2,68 <sup>*/a</sup>  | 49,83±4,00 <sup>*/a</sup>  |

Cada valor es la media±error típico, n=6

<sup>\*</sup> La presencia de asteriscos dentro de la misma fila indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a,b</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

<sup>o</sup> RGR: recuento de glóbulos rojos, TIBC: capacidad total de fijación del hierro, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, HDL: lipoproteínas de alta densidad

#### 4.3. Recuento microbiológico total y de bifidobacterias fecales en heces de ratas

En la **Tabla 41** se muestran los recuentos, expresados en log ufc/g de heces, de los microorganismos aerobios y anaerobios totales y de las bifidobacterias encontrados en las heces de las ratas estudiadas en los tres periodos de tres días de balance. En el recuento de aerobios mesófilos totales sólo fueron detectadas diferencias puntuales de los grupos objeto de estudio respecto al control, siendo destacable que al finalizar el estudio (3<sup>er</sup> periodo) ninguno de ellos presentó recuentos mayores al grupo control. En el recuento de anaerobios mesófilos totales, se observó en el 1<sup>er</sup> periodo un recuento significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior en el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 1,2% (6,40 log ufc/g heces) respecto al grupo control, en el 2<sup>o</sup> periodo en los grupos alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 10% (6,82 y 6,97 log ufc/g heces, respectivamente) y en el 3<sup>er</sup> periodo en los grupos alimentados con la dieta prebiótica al 10% y las dietas simbióticas (de 7,17 log ufc/g heces con la dieta simbiótica al 5% a 7,85 log ufc/g heces con la dieta prebiótica al 10%). En cuanto al recuento de bifidobacterias, en el 1<sup>er</sup> periodo, sólo el grupo alimentado con dieta simbiótica al 10% mostró un recuento significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (7,37 log ufc/g heces) al grupo control (6,84 log ufc/g heces). Cabría señalar que los únicos grupos que mostraron mayores valores (superiores a 7 log ufc/g heces) fueron los grupos a los que se les adicionó bifidobacterias en las dietas prebiótica y simbióticas. En el 2<sup>o</sup> periodo, todos los recuentos descendieron en general, mostrando valores significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores los grupos alimentados con dietas simbióticas (6,26, 7,08 y 6,61 log ufc/g heces, respectivamente) frente al grupo alimentado con la dieta control (5,62 log ufc/g heces). Estos datos sugieren que mientras el recuento de anaerobios totales permanece sin alteraciones en estos grupos, el 4'-GOS está siendo utilizado preferentemente por las bifidobacterias, mejorando su crecimiento a expensas de otras especies bacterianas del intestino grueso. Sin embargo, en el 3<sup>er</sup> periodo todos los grupos incluido el grupo control (6,35 log ufc/g heces) presentaron un ligero aumento en sus recuentos de bifidobacterias sin haber diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los mismos, excepto el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 1,2% con un mayor recuento (7,07 log ufc/g heces).

Recientemente, Bielecka y col. (2002) encontraron en un estudio con ratas adultas que la administración de oligofructosa al 5% durante catorce días aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) el número de bifidobacterias en heces en un 1,6 log ufc/g respecto al grupo control, mientras que la administración junto a *B. longum* lo hizo en 1,4 log ufc/g. Sin embargo, el recuento de bacterias aerobias mesófilas (de 7,79 a 8,81 log ufc/g) y anaerobias facultativas no difirió entre los grupos problema y control. Nuestros resultados no mostraron ningún efecto en el 1<sup>er</sup> periodo posiblemente debido a que las ratas solamente llevaban tomando las dietas problema como único alimento tres días (los cinco primeros se utilizaron como periodo de adaptación a las nuevas dietas y éstas se administraban en concentraciones crecientes mezcladas con la dieta AO4). En el 2<sup>o</sup> periodo, los grupos alimentados con la dieta simbiótica

mostraron un incremento desde 0,64 log ufc/g con la dieta simbiótica al 1,2% hasta 1,46 log ufc/g con la dieta simbiótica al 5% con respecto al grupo control (5,28 log ufc/g). Y en el último periodo, el único que mostró un recuento significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control (6,35 log ufc/g) fue el alimentado con la dieta prebiótica al 1,2% (7,07 log ufc/g). Por tanto la dieta probiótica por sí sola no fue suficiente para producir un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el número de bifidobacterias fecales en ratas. La incorporación conjunta de un prebiótico, 4'-GOS en nuestro caso, y un probiótico mejoró significativamente los recuentos de estos últimos en el 2º periodo. Por el contrario en el 3º periodo, en el que no se observó dicho efecto, puede estar motivado por la reducción del número de bifidobacterias intestinales que ocurre con la edad (Drasar y Hill, 1974; Mitsuoka, 1984).

**Tabla 41.** Recuento microbiológico de aerobios, anaerobios y bifidobacterias en heces de ratas

| Periodo    | Dietas          | Bacterias                     |                                 |                           |
|------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
|            |                 | Mesófilos aerobios<br>totales | Mesófilos anaerobios<br>totales | Bifidobacterias           |
| 8-10 días  | AO4             | 6,72±0,50                     | 8,14±0,16                       | 6,58±0,05                 |
|            | Control         | 6,86±0,24                     | 7,68±0,11                       | 6,84±0,21                 |
|            | Probiótica      | 7,97±0,07 <sup>*/a</sup>      | 7,86±0,11 <sup>a</sup>          | 7,06±0,00 <sup>b</sup>    |
|            | Prebiótica 1,2% | 6,26±0,12 <sup>*/d</sup>      | 6,40±0,11 <sup>*/c</sup>        | 6,41±0,06 <sup>c</sup>    |
|            | Prebiótica 5%   | 7,28±0,16 <sup>abc</sup>      | 7,47±0,08 <sup>ab</sup>         | 6,54±0,19 <sup>abc</sup>  |
|            | Prebiótica 10%  | 6,83±0,08 <sup>bd</sup>       | 7,23±0,07 <sup>b</sup>          | 6,83±0,06 <sup>b</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 7,01±0,03 <sup>b</sup>        | 7,74±0,24 <sup>ab</sup>         | 7,03±0,13 <sup>ab</sup>   |
|            | Simbiótica 5%   | 6,99±0,16 <sup>bcd</sup>      | 7,78±0,19 <sup>ab</sup>         | 7,25±0,03 <sup>a</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 6,66±0,04 <sup>cd</sup>       | 7,37±0,07 <sup>ab</sup>         | 7,37±0,00 <sup>*/a</sup>  |
| 18-20 días | AO4             | 7,28±0,16                     | 7,75±0,11                       | 5,28±0,09                 |
|            | Control         | 6,77±0,31                     | 7,51±0,21                       | 5,62±0,19                 |
|            | Probiótica      | 7,21±0,29 <sup>a</sup>        | 7,17±0,07 <sup>ab</sup>         | 5,13±0,07 <sup>c</sup>    |
|            | Prebiótica 1,2% | 6,70±0,13 <sup>a</sup>        | 7,14±0,07 <sup>ab</sup>         | 5,52±0,15 <sup>bc</sup>   |
|            | Prebiótica 5%   | 6,80±0,15 <sup>a</sup>        | 7,11±0,09 <sup>ab</sup>         | 5,96±0,06 <sup>b</sup>    |
|            | Prebiótica 10%  | 6,69±0,18 <sup>a</sup>        | 6,82±0,07 <sup>*/b</sup>        | 5,73±0,08 <sup>b</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 6,76±0,12 <sup>a</sup>        | 7,46±0,07 <sup>a</sup>          | 6,26±0,11 <sup>*/ab</sup> |
|            | Simbiótica 5%   | 7,58±0,24 <sup>*/a</sup>      | 7,76±0,16 <sup>a</sup>          | 7,08±0,20 <sup>*/a</sup>  |
|            | Simbiótica 10%  | 6,59±0,13 <sup>a</sup>        | 6,97±0,18 <sup>*/ab</sup>       | 6,61±0,26 <sup>*/ab</sup> |
| 28-30 días | AO4             | 6,76±0,03                     | 8,03±0,17                       | 6,29±0,14                 |
|            | Control         | 7,51±0,16                     | 8,28±0,05                       | 6,35±0,02                 |
|            | Probiótica      | 7,57±0,12 <sup>ab</sup>       | 8,05±0,06 <sup>a</sup>          | 6,89±0,08 <sup>a</sup>    |
|            | Prebiótica 1,2% | 7,01±0,08 <sup>c</sup>        | 8,12±0,04 <sup>a</sup>          | 7,07±0,03 <sup>*/a</sup>  |
|            | Prebiótica 5%   | 7,81±0,04 <sup>a</sup>        | 8,16±0,02 <sup>a</sup>          | 6,76±0,09 <sup>a</sup>    |
|            | Prebiótica 10%  | 7,08±0,18 <sup>ac</sup>       | 7,85±0,14 <sup>*/ab</sup>       | 6,83±0,24 <sup>a</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 7,16±0,25 <sup>ac</sup>       | 7,73±0,19 <sup>*/ab</sup>       | 6,54±0,19 <sup>a</sup>    |
|            | Simbiótica 5%   | 6,69±0,20 <sup>*/bc</sup>     | 7,17±0,14 <sup>*/b</sup>        | 6,80±0,19 <sup>a</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 6,35±0,28 <sup>*/bc</sup>     | 7,53±0,11 <sup>*/b</sup>        | 6,72±0,21 <sup>a</sup>    |

Cada valor es la media del log ufc/g heces en peso húmedo±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-d</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

#### 4.4. Balances minerales

En las siguientes tablas (de la 42 a la 46) se muestran los balances minerales de Ca, Mg, P y Fe medidos a través del cálculo de la absorción aparente (AA) y retención de estos minerales. Así mismo, también se muestran los contenidos minerales excretados por heces y orina expresados en mg de mineral/g de heces (en peso seco) y mg de mineral/mL de orina, respectivamente. Junto a estos valores igualmente se muestran los contenidos minerales excretados por día. De esta manera se puede apreciar si el mayor porcentaje de absorción aparente y/o de retención de un mineral es debido a su menor presencia en las heces y/u orina, o si por el contrario se debe a un menor volumen de excreción fecal o urinaria.

##### 4.4.1. Balance del calcio

La **Tabla 42** muestra el balance mineral del Ca en tres periodos de tres días cada uno durante el tiempo en el que se les administró los diferentes tipos de dietas a las ratas. La AA de Ca, que únicamente tiene en cuenta las pérdidas por heces, mostró en el 1<sup>er</sup> periodo que todos los grupos problema tuvieron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores al grupo control (91,70%), excepto el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 1,2% (92,77%) debido a su mayor error típico. Sin embargo, no existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes grupos problema, oscilando sus valores desde 92,77 para la dieta prebiótica al 1,2% hasta 98,04% para la dieta prebiótica al 10%. En el 2<sup>o</sup> periodo, todos los grupos mostraron una AA de Ca superior ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo control (73,66%), excepto los alimentados con las dietas probiótica y simbiótica al 1,2% (79,99 y 76,06%, respectivamente). Los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 1,2% y 10%, y simbiótica al 10% mostraron una AA más elevada (93,76, 95,80 y 94,55%, respectivamente) respecto al resto de grupos problema. En el 3<sup>er</sup> periodo, de nuevo todos los grupos problema presentaron una AA superior a la del grupo control (58,77%), sin embargo, en el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% (64,80%) esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). El resto de grupos mostró unos valores entre 77,25 y 86,26% para las dietas prebiótica y simbiótica al 5 y 10%, respectivamente.

En los tres periodos se observó que todos los grupos problema excretaron por heces una cantidad diaria de Ca significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior a la excretada por el grupo control, lo cual se reflejó en una mayor AA de Ca en casi todos los grupos, con la excepción de los alimentados con las dietas prebiótica al 1,2% (en el 1<sup>er</sup> periodo), probiótica (en el 2<sup>o</sup> periodo) y simbiótica al 1,2% (en el 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> periodo). Estas diferencias pueden ser debidas a una menor ingestión de Ca respecto al grupo control tal y como se observa en la Tabla 39.

La retención mineral tiene en cuenta las pérdidas minerales que se producen por orina, y por tanto permite obtener un valor más real que la AA. Para el Ca en el 1<sup>er</sup> periodo, las mayores pérdidas por orina supusieron un descenso de un 8,5 y 8,7% respecto al valor de la

AA en los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% respectivamente, debido a que excretaron una cantidad de Ca por orina significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control. Por este motivo el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 5% mostró una menor retención de Ca (86,92%) que el grupo control (91,68%), siendo los grupos alimentados con las dietas probiótica y simbióticas al 1,2 y 10% los que mostraron los porcentajes más elevados (de 96,28 a 97,01% para las dietas simbióticas al 10% y 1,2%, respectivamente). En el 2º periodo sin embargo, al ser menores las pérdidas de Ca por orina, todos los grupos presentaron una retención de Ca superior a la del grupo control (73,02%), siendo los grupos alimentados con las dietas prebióticas y simbióticas al 5 y 10% los que mostraron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores (de 82,64 a 93,53% para las dietas prebiótica al 5% y simbiótica al 10%, respectivamente). En el 3º periodo, se mantuvieron las diferencias descritas en el periodo anterior con todos los grupos, con una retención de Ca superior al grupo control pero con porcentajes de retención algo más bajos; además la retención de los grupos alimentados con las dietas prebióticas y simbióticas al 5 y 10% (de 76,56% para la dieta prebiótica al 5% a 85,14% para la dieta prebiótica al 10%) fue de nuevo significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la del grupo control (58,19%).

Finalmente cabría reseñar los elevados porcentajes AA y retención de Ca encontrados en todos los grupos alimentados con fórmula infantil respecto al alimentado con la dieta A04. También hay que destacar que en todos los grupos éstos porcentajes descendieron con el tiempo, posiblemente debido al descenso de los requerimientos del organismo que se produce con la edad. La excreción urinaria de Ca supuso muy poca aportación en el conjunto final del balance mineral de este elemento, únicamente destacable en los grupos alimentados con la dieta prebiótica al 5 y 10% en el 1º periodo. Los únicos grupos que mostraron una AA y retención de Ca significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control en los tres periodos fueron los alimentados con las dietas simbióticas al 5 y 10%, mientras que en los grupos alimentados con las dietas prebióticas se observó esta diferencia en los dos últimos periodos. En los grupos alimentados con las dietas simbióticas se observó una cierta relación dosis-efecto, en el 2º y 3º periodo en la concentración de 5 y 10% respecto a la de 1,2%, es decir que una mayor concentración de 4'-GOS produjo una mayor AA y retención de Ca. El consumo de las dietas simbióticas únicamente mejoró la retención de Ca respecto a los grupos alimentados con las dietas probiótica y prebióticas de forma muy puntual. Así en el 1º y 2º periodo el grupo alimentado con dieta simbiótica al 5% tuvo una retención de Ca significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al alimentado con la dieta prebiótica al 5%, y en el 3º periodo el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 10% presentó una AA y retención de Ca significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al alimentado con la dieta probiótica.

**Tabla 42.** Balance mineral del calcio

| Periodo    | Dietas          | Absorción aparente (%)     | Retención (%)              | Excreción fecal (mg/g)     | Excreción fecal (mg/día)    | Excreción urinaria (mg/mL) | Excreción urinaria (mg/día) |
|------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 8-10 días  | AO4             | 43,77±0,88                 | 45,34±1,94                 | 10,95±0,49                 | 86,78±1,83                  | 0,035±0,001                | 0,17±0,083                  |
|            | Control         | 91,70±0,97                 | 91,68±0,97                 | 5,72±0,50                  | 4,25±0,49                   | 0,003±0,000                | 0,008±0,002                 |
|            | Probiótica      | 96,97±0,33 <sup>*/a</sup>  | 96,69±0,24 <sup>*/a</sup>  | 2,33±0,22 <sup>*/bd</sup>  | 0,92±0,05 <sup>*/a</sup>    | 0,043±0,014 <sup>c</sup>   | 0,091±0,034 <sup>c</sup>    |
|            | Prebiótica 1,2% | 92,77±1,89 <sup>a</sup>    | 92,41±1,86 <sup>abc</sup>  | 5,06±0,18 <sup>a</sup>     | 2,40±0,66 <sup>*/a</sup>    | 0,032±0,001 <sup>c</sup>   | 0,12±0,021 <sup>c</sup>     |
|            | Prebiótica 5%   | 95,47±0,39 <sup>*/a</sup>  | 86,92±0,54 <sup>*/c</sup>  | 3,35±0,28 <sup>*/c</sup>   | 1,64±0,12 <sup>*/a</sup>    | 0,97±0,079 <sup>*/a</sup>  | 3,09±0,17 <sup>*/a</sup>    |
|            | Prebiótica 10%  | 98,04±0,47 <sup>*/a</sup>  | 89,32±0,56 <sup>bc</sup>   | 1,52±0,13 <sup>*/b</sup>   | 0,72±0,18 <sup>*/a</sup>    | 0,79±0,029 <sup>*/a</sup>  | 3,19±0,32 <sup>*/a</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 97,04±0,79 <sup>*/a</sup>  | 97,01±0,78 <sup>*/a</sup>  | 4,37±0,10 <sup>*/a</sup>   | 0,89±0,27 <sup>*/a</sup>    | 0,006±0,001 <sup>c</sup>   | 0,008±0,002 <sup>c</sup>    |
|            | Simbiótica 5%   | 96,40±0,69 <sup>*/a</sup>  | 96,28±0,76 <sup>*/a</sup>  | 2,70±0,10 <sup>*/cd</sup>  | 1,04±0,13 <sup>*/a</sup>    | 0,026±0,012 <sup>c</sup>   | 0,032±0,019 <sup>c</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 97,95±0,69 <sup>*/a</sup>  | 93,02±2,01 <sup>ab</sup>   | 2,05±0,08 <sup>*/bd</sup>  | 0,63±0,21 <sup>*/a</sup>    | 0,48±0,052 <sup>*/b</sup>  | 1,51±0,39 <sup>*/b</sup>    |
| 18-20 días | AO4             | 39,57±2,27                 | 38,32±2,45                 | 10,50±0,27                 | 120,33±8,36                 | 0,34±0,066                 | 2,51±0,53                   |
|            | Control         | 73,66±1,57                 | 73,02±1,39                 | 11,65±0,71                 | 15,44±0,29                  | 0,15±0,084                 | 0,48±0,29                   |
|            | Probiótica      | 79,99±1,07 <sup>cd</sup>   | 79,38±1,15 <sup>c</sup>    | 8,36±0,48 <sup>bcd</sup>   | 7,95±0,60 <sup>*/a</sup>    | 0,10±0,017 <sup>bc</sup>   | 0,24±0,046 <sup>bc</sup>    |
|            | Prebiótica 1,2% | 93,76±1,04 <sup>*/a</sup>  | 92,09±1,07 <sup>*/ab</sup> | 5,85±0,51 <sup>*/bce</sup> | 2,98±0,46 <sup>*/b</sup>    | 0,40±0,045 <sup>a</sup>    | 0,79±0,096 <sup>abc</sup>   |
|            | Prebiótica 5%   | 84,03±1,97 <sup>*/bc</sup> | 82,64±1,81 <sup>*/c</sup>  | 9,64±1,20 <sup>bc</sup>    | 7,32±0,69 <sup>*/a</sup>    | 0,28±0,046 <sup>abc</sup>  | 0,65±0,11 <sup>abc</sup>    |
|            | Prebiótica 10%  | 95,80±1,29 <sup>*/a</sup>  | 92,85±1,49 <sup>*/ab</sup> | 3,74±0,75 <sup>*/e</sup>   | 2,05±0,75 <sup>*/b</sup>    | 0,38±0,097 <sup>ab</sup>   | 1,42±0,38 <sup>*/a</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 76,06±1,13 <sup>d</sup>    | 76,02±1,14 <sup>c</sup>    | 14,58±1,60 <sup>a</sup>    | 8,42±0,22 <sup>*/a</sup>    | 0,013±0,001 <sup>c</sup>   | 0,017±0,005 <sup>c</sup>    |
|            | Simbiótica 5%   | 91,24±0,73 <sup>*/ab</sup> | 91,22±0,73 <sup>*/ab</sup> | 5,32±0,50 <sup>*/bce</sup> | 3,46±0,30 <sup>*/b</sup>    | 0,010±0,003 <sup>c</sup>   | 0,012±0,004 <sup>c</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 94,55±3,14 <sup>*/a</sup>  | 93,53±3,36 <sup>*/a</sup>  | 3,41±1,06 <sup>*/de</sup>  | 2,22±1,17 <sup>*/b</sup>    | 0,012±0,005 <sup>abc</sup> | 0,43±0,092 <sup>abc</sup>   |
| 28-30 días | AO4             | 29,48±4,74                 | 29,06±4,75                 | 12,90±0,78                 | 149,00±7,70                 | 0,12±0,007                 | 0,89±0,029                  |
|            | Control         | 58,77±2,94                 | 58,19±2,94                 | 12,53±1,22                 | 26,74±2,82                  | 0,065±0,016                | 0,37±0,025                  |
|            | Probiótica      | 69,79±4,03 <sup>*/bc</sup> | 68,94±4,00 <sup>bc</sup>   | 10,76±0,77 <sup>a</sup>    | 18,10±1,91 <sup>*/a</sup>   | 0,21±0,014 <sup>a</sup>    | 0,59±0,076 <sup>a</sup>     |
|            | Prebiótica 1,2% | 82,69±0,95 <sup>*/a</sup>  | 81,70±1,16 <sup>*/a</sup>  | 8,46±0,61 <sup>a</sup>     | 10,77±0,83 <sup>*/bcd</sup> | 0,17±0,034 <sup>a</sup>    | 0,63±0,14 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 5%   | 77,25±3,93 <sup>*/a</sup>  | 76,56±3,91 <sup>*/ab</sup> | 10,86±1,69 <sup>ab</sup>   | 15,37±2,52 <sup>*/ac</sup>  | 0,14±0,028 <sup>a</sup>    | 0,47±0,091 <sup>a</sup>     |
|            | Prebiótica 10%  | 85,75±0,84 <sup>*/a</sup>  | 85,14±0,86 <sup>*/a</sup>  | 8,93±0,82 <sup>ab</sup>    | 10,32±0,79 <sup>*/ad</sup>  | 0,22±0,075 <sup>a</sup>    | 0,44±0,043 <sup>a</sup>     |
|            | Simbiótica 1,2% | 64,80±3,01 <sup>c</sup>    | 62,34±3,53 <sup>c</sup>    | 15,71±2,53 <sup>ab</sup>   | 17,58±1,91 <sup>*/ab</sup>  | 0,15±0,041 <sup>a</sup>    | 0,35±0,068 <sup>a</sup>     |
|            | Simbiótica 5%   | 80,69±0,82 <sup>*/ab</sup> | 79,65±0,84 <sup>*/ab</sup> | 7,18±0,88 <sup>ab</sup>    | 10,11±0,88 <sup>*/bcd</sup> | 0,22±0,056 <sup>a</sup>    | 0,54±0,036 <sup>a</sup>     |
|            | Simbiótica 10%  | 86,26±2,06 <sup>*/a</sup>  | 85,13±2,09 <sup>*/a</sup>  | 4,09±0,46 <sup>*/b</sup>   | 7,08±0,79 <sup>*/d</sup>    | 0,17±0,063 <sup>a</sup>    | 0,59±0,17 <sup>a</sup>      |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-e</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos, indican diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

Los elevados porcentajes de absorción de Ca que hemos obtenido en nuestro estudio, también (entre un 80 y 90%) han sido encontrados por otros autores mediante el empleo de diferentes OND como los FOS cc, TGOS y 4'-GOS al 5 y 10% (Chonan y Watanuki, 1995; Chonan y Takahashi, 1999; Ohta y col., 1998d; Chonan y col., 2001). Además, Chonan y Watanuki (1996) observaron que cuando el contenido de Ca en la dieta era bajo (215 mg de Ca/100 g), la administración de un 5% de 6'-GOS a ratas durante 30 días, originó una AA de Ca significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor (superior al 95%) en los tres periodos de balance mineral respecto al grupo con un contenido normal de Ca (2.150 mg de Ca/100 g) en la dieta. Las dietas empleadas en este estudio aportaron 571,72 mg de Ca/100 g, lo que puede considerarse un contenido moderadamente bajo comparado con el anterior estudio.

Otros autores (Sarriá y col., 2001) también han encontrado elevados porcentajes de absorción de Ca, entorno al 97%, en ratas lactantes que consumieron fórmula infantil durante siete días. Para estos autores los elevados valores de absorción están asociados al alto contenido en lactulosa de las fórmulas infantiles y a la aparición, en el destete de las ratas, de un sistema de transporte de Ca mediado por transportadores (Bronner, 1987) además de la difusión pasiva, principal mecanismo de absorción de Ca hasta la 2ª semana de vida la rata. En nuestro estudio, el porcentaje de AA encontrado en la fórmula infantil control en el 1<sup>er</sup> periodo fue ligeramente inferior (91,7%) al descrito por Sarriá y col., aunque éste aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) con la incorporación de los probióticos y prebióticos a la fórmula infantil. Además, hay que tener en cuenta que la mayoría de estos estudios se han realizado con animales jóvenes, los cuales tienen incrementadas las necesidades de Ca para la formación ósea (NRC, 1991) durante la etapa de crecimiento.

Durante la elaboración de fórmulas infantiles se emplean los tratamientos térmicos de secado y esterilización, que pueden inducir la isomerización de la lactosa, dando lugar a lactulosa. A pesar de que la cantidad de lactulosa formada durante el tratamiento térmico pueda ser baja debido a la baja actividad agua del producto y las condiciones térmicas moderadas (Sarriá y col., 2001), ésta llega prácticamente íntegra al colon ya que resiste la hidrólisis enzimática del intestino delgado. Este isómero de la lactosa mejora la absorción de Ca más intensamente que la lactosa (Brommage y col., 1993). En nuestro estudio, por tratarse de dietas elaboradas a base de leche sometida a tratamientos térmicos de desecado y pasteurización, la lactulosa formada (90-150 mg/L en fórmulas en polvo (Sarriá-Ruiz, 1998) puede explicar en parte la elevada absorción mineral los grupos control y problema respecto al grupo alimentado con la dieta AO4.

Otra de las razones que posiblemente explican los elevados valores de absorción de Ca obtenidos, pueden ser la fuente de Ca (cloruro y citrato cálcico) utilizada en el mix de minerales que se le añade a las fórmulas infantiles, ya que el citrato cálcico presenta la ventaja de su elevada solubilidad sobre otras fuentes de Ca ampliamente utilizadas como el carbonato cálcico (Harvey y col., 1988).

En la absorción de Ca también influye la fuente proteica de la fórmula infantil utilizada. Lönnerdal y col. (1994) estudiaron la biodisponibilidad mineral en ratas lactantes alimentadas con leche de vaca, leche humana y diversas fórmulas infantiles con diferente fuente proteica (caseína, proteína de suero, hidrolizados proteicos o soja). Observaron que la absorción de Ca de las fórmulas infantiles, incluyendo la enriquecida con proteína de suero como es nuestro caso, era mayor a un 70%. La única absorción más baja detectada correspondió a la fórmula con proteína de soja.

Aunque la fórmula infantil desde un punto de vista nutricional trata de asemejarse cuantitativa y cualitativamente a la leche humana, está ampliamente aceptado que la leche humana es la mejor fuente de Ca para el hombre, especialmente durante la lactancia. Son varias las razones que pueden explicar las diferencias observadas en la biodisponibilidad de Ca entre la leche humana y las fórmulas infantiles. En la leche humana el Ca está principalmente unido a proteínas del suero o como parte de complejos de bajo peso molecular, mientras que la leche de vaca, está unida principalmente a la caseína (Fransson y Lönnerdal, 1983). Además puede influir la diferente distribución del Ca entre la caseína y las proteínas del suero, ya que mientras que en la leche humana la caseína principal es una  $\beta$ -caseína, en la de vaca es una  $\alpha$ -caseína (Kunz y Lönnerdal, 1992). En el caso de las proteínas del suero, la lactoferrina es la principal proteína en la leche humana y la  $\beta$ -lactoglobulina en la de vaca (Lönnerdal, 1997). También se debería mencionar que la caseína de la leche forma grandes micelas que contiene fosfato cálcico coloidal, mientras que la leche humana las micelas son pequeñas (Kunz y Lönnerdal, 1992), pudiendo afectar este hecho a la precipitación y digestibilidad en el tracto GI (Lönnerdal, 1997). Se ha destacado que los fosfopéptidos formados durante la digestión enzimática de la caseína, más probable en la de leche materna que en la de vaca, tienen un efecto positivo en la absorción del Ca (Mellander, 1950) debido a su habilidad para unir Ca e inhibir su precipitación, y así mantenerlo en forma soluble en el lumen intestinal y por tanto disponible para la absorción.

Como conclusión a los resultados obtenidos en el balance mineral del Ca podemos afirmar que todos los grupos problema presentaron en alguno de los periodos una AA y retención de Ca significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la del control. La adición de prebióticos fue más efectiva que la de los probióticos, ya que mientras que éstos sólo fueron claramente superiores al grupo control en el 1<sup>er</sup> periodo, los grupos alimentados con dieta prebiótica lo fueron en el 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> periodo. El aumento de concentración de 4'-GOS en la dieta no mostró una clara relación dosis-efecto sobre la absorción de Ca. La adición conjunta de ambos en forma de dieta simbiótica tampoco mostró una clara mejora en la absorción de Ca respecto a su administración individualizada. Sin embargo, los grupos alimentados con las dietas simbióticas al 5 y 10% fueron los más eficaces al mostrar una AA y retención de Ca significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la grupo control en los tres periodos.

#### 4.4.2. Balance del magnesio

La **Tabla 43** muestra el balance mineral del Mg en tres periodos de tres días cada uno durante el tiempo en el que se les administró los diferentes tipos de dietas a las ratas. En el 1<sup>er</sup> periodo el único grupo que mostró un porcentaje de AA significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la del grupo control (82,85%) fue el alimentado con la dieta simbiótica al 10% (94,74%), mientras que el resto de grupos problema no mostraron diferencias con el grupo control. Entre los grupos problema, los alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% y simbióticas fueron los que mostraron los mayores valores (de 86,68% con la dieta prebiótica al 5% a 94,74% con la dieta simbiótica al 10%) al excretar una cantidad diaria de Mg en heces significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior a la del grupo control (0,73 mg/día). En el 2<sup>o</sup> periodo, los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 1,2 y 10% y simbióticas al 5 y 10% presentaron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores (de 90,35% con la dieta prebiótica al 1,2% a 95,06% con la dieta simbiótica al 10%) al del grupo control (81,92%) y al alimentado con la dieta probiótica. Como se observa en la variable excreción fecal, estos grupos fueron los que excretaron una cantidad diaria de Mg en heces significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior a la del grupo control (0,85 mg/día). En el 3<sup>er</sup> periodo, excepto los grupos alimentados con las dietas probiótica y prebiótica al 5% (76,95 y 81,18%, respectivamente), el resto mostró una AA de Mg significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (de 85,59% con la dieta prebiótica al 1,2% a 90,90% con la dieta simbiótica al 10%) a la del grupo control (76,63%). Nuevamente, estos fueron los grupos que excretaron una cantidad diaria de Mg en heces significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior a la del grupo control (1,32 mg/día).

Las pérdidas de Mg por orina fueron más acusadas que las de Ca, sobre todo en determinados grupos y periodos, lo que redujo significativamente el porcentaje de retención de este mineral. Así, el grupo alimentado con dieta simbiótica al 10% descendió un 3,3 y 3,7% sus porcentajes de retención de Mg en los dos primeros periodos, mientras que en el 3<sup>er</sup> periodo fueron los grupos alimentados con dieta simbiótica al 1,2 y 5% los que más Mg excretaron por orina al descender el porcentaje en un 16,8 y 23,15%, respectivamente. En el 1<sup>er</sup> periodo, únicamente el grupo alimentado con dieta prebiótica al 1,2% mostró un porcentaje (66,97%) significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al del grupo control (81,78%), puesto que fue el único grupo que excretó una cantidad diaria de Mg por orina significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que la del grupo control (0,046 mg/día). Entre los grupos problema los alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% y simbióticas fueron los que mostraron los mayores valores (de 86,49% con la dieta prebiótica al 5% a 91,45% con la dieta simbiótica al 10%). En el 2<sup>o</sup> periodo, los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 10% y simbióticas al 5 y 10% fueron los que presentaron unos porcentajes significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores (90,48, 92,61 y 89,67%, respectivamente) a los del grupo alimentado con la dieta control (78,41%), aunque no las mostraron con los grupos alimentados con el resto de dietas prebióticas y simbióticas. Estas diferencias fueron debidas a la menor excreción de Mg estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ )

respecto al grupo control (0,16 mg/día), calculada por heces y día. En el 3<sup>er</sup> periodo, los grupos alimentados con todas las dietas prebióticas y la simbiótica al 10% fueron los que presentaron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores al grupo control (de 80,99% con la dieta prebiótica al 5% a 90,69% con la dieta simbiótica al 10%). Sin embargo, los grupos alimentados con las dietas simbióticas al 1,2 y 5% mostraron los valores más reducidos debido a la mayor pérdida de Mg por orina, siendo en el segundo grupo significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al grupo control ( $p < 0,05$ ).

Como conclusión al balance del Mg se ha de reseñar de nuevo los elevados porcentajes de AA y retención encontrados en todos los grupos alimentados con fórmula infantil respecto al alimentado con la dieta AO4. También hay que destacar que en todos los grupos éstos porcentajes fueron descendiendo con la edad de los animales, aunque al contrario que ocurrió con el Ca, el número de grupos con una AA y retención significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control fue siendo mayor conforme avanzó el estudio. Los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 10% y simbióticas al 5 y 10% fueron los que mostraron unos valores de AA y retención de Mg significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores al grupo control en los dos últimos periodos, y de ellos el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 10% fue el único en mostrar una AA de Mg significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control en todos los periodos. La relación dosis-efecto respecto a la variación de la concentración de 4'-GOS únicamente fue observada para la dieta prebiótica en el 1<sup>er</sup> periodo y para la simbiótica en el tercero.

Diversos estudios con ratas muestran que cuando se añaden a la dieta diferentes OND la absorción de Mg se incrementa significativamente. La administración de dietas con 5% de 4'-GOS a ratas, obtuvo como resultado una AA de Mg del 87,4% frente al 56,9% del grupo control (Chonan y col., 2001). En otro estudio con ratas laparotomizadas y una dieta con 5% de GOS, la AA de Mg fue de 90,6% frente al 60,2% del control (Chonan y Takahashi, 1999). Por otra parte, estudios más largos en el tiempo con OND diferentes muestran resultados similares a los nuestros. La administración de un 5% FOS cc a la dieta de ratas durante tres periodos de balance (3-7 días, 14-18 días y 27-31 días) produjo una AA de Mg significativamente ( $p < 0,01$ ) mayor (83,1, 78,3 y 73,3%, respectivamente) que el grupo control (61, 55,3 y 49,8%, respectivamente) (Ohta y col., 1993). Delzenne y col. (1995) encontraron en ratas alimentadas con una dieta (0,1 g/100 g de Mg) con inulina u oligofruktosa al 10%, una retención de Mg del 75%. Ratas de cinco semanas que se alimentaron con una dieta con 10% FOS cc mostraron una retención de Mg del 90,7% en el 1<sup>er</sup> periodo (10-14 días) y del 85,9% en el 2<sup>o</sup> periodo (24-28 días) (Ohta y col., 1998d). En base a estas referencias podemos afirmar que el incremento en la absorción y retención de Mg en este estudio y debido a la dieta con 4'-GOS, está en consonancia con los datos hallados en la bibliografía.

No obstante, en la absorción de Mg influyen otros factores como la concentración de otros minerales presentes en la dieta (Ohta y col., 1994a). Estos autores observaron que en una dieta con contenido normal de Ca (520 mg/ 100 g) y normal de P (800 mg/100 g) la AA de Mg eran mayor (83,6%) que con contenido normal de Ca y alto de P (1.200 mg/ 100 g)

(59,3%). En nuestro estudio los contenidos de Ca y P fueron de 572 y 344 mg/100 g, respectivamente, contenidos que pueden ser considerados normales.

Estudios de balance con niños nacidos a término (Skyberg y col., 1968) muestran una absorción de Mg de 55-75%, similares a los encontrados en nuestro estudio. Se sabe que la absorción de Mg en ratas jóvenes, al igual que en el hombre (Shils, 1988), no se produce mediante transporte activo, por lo que la difusión pasiva vía ruta pericelular parece ser el único mecanismo de absorción durante las primeras semanas (Meneely y col., 1982). Una explicación a esta similitud, además del posible efecto ejercido por los probióticos y prebióticos añadidos a las fórmulas infantiles sobre la absorción de Mg, es el hecho de la mayoría del Mg encontrado tanto en la leche humana como en las fórmulas infantiles, está en la fracción soluble del mismo (92% en la fracción del suero de la leche humana y 83% en fórmula con suero lácteo) (Lönnerdal y col., 1993). Además, estos mismos autores en ratas lactantes observaron que ni la cantidad de Mg o Ca en la dieta, ni las diferentes fuentes de Mg usadas en las fórmulas infantiles ( $MgHPO_4$ ,  $MgCl_2$ ,  $MgO$ ) afectaron a la absorción de Mg. También señalaron que probablemente la abundancia de ligandos presentes en la fórmula infantil ayudan a solubilizar el Mg, como se demostró en un estudio *in vitro* simulando las condiciones del tracto GI, donde el citrato tenía la mayor capacidad para formar complejos absorbibles con el Mg (Blaquiere y Berthon, 1987).

Como conclusión al balance mineral del Mg podemos afirmar que de forma general los grupos problema tuvieron una AA y retención superior al grupo control, con valores significativamente superiores a este último en los periodos 2º y 3º. Es de destacar que el grupo alimentado con la dieta probiótica mostró los valores más bajos en los tres periodos entre los grupos problema y nunca fue significativamente superior al control. Únicamente se observó una clara relación dosis-efecto en los grupos alimentados con la dieta prebiótica en el 1º periodo y con la dieta simbiótica en el 3º periodo. El mayor efecto de las dietas simbióticas respecto a las prebióticas, se observó únicamente en la AA y retención de Mg del grupo alimentado con la dieta simbiótica al 1,2%, y en la AA de Mg en el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 5%. Sin embargo, las dietas prebiótica al 10% y simbióticas al 5 y 10% se mostraron como las más eficaces al obtener una significativa mayor AA y retención de Mg en los dos últimos periodos.

**Tabla 43.** Balance mineral del magnesio

| Periodo    | Dietas          | Absorción aparente (%)    | Retención (%)            | Excreción fecal (mg/g)   | Excreción fecal (mg/día) | Excreción urinaria (mg/mL) | Excreción urinaria (mg/día) |
|------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 8-10 días  | AO4             | 52,06±2,53                | 50,30±2,83               | 1,70±0,10                | 14,99±1,19               | 0,13±0,035                 | 0,55±0,10                   |
|            | Control         | 82,85±3,94                | 81,78±3,89               | 0,96±0,16                | 0,73±0,16                | 0,014±0,007                | 0,046±0,022                 |
|            | Probiótica      | 80,86±3,42 <sup>b</sup>   | 77,50±3,45 <sup>bc</sup> | 1,30±0,10 <sup>ab</sup>  | 0,52±0,07 <sup>b</sup>   | 0,046±0,006 <sup>a</sup>   | 0,092±0,014 <sup>abc</sup>  |
|            | Prebiótica 1,2% | 71,47±1,44 <sup>c</sup>   | 66,97±2,67 <sup>*c</sup> | 1,41±0,04 <sup>a</sup>   | 0,78±0,10 <sup>a</sup>   | 0,047±0,007 <sup>a</sup>   | 0,18±0,015 <sup>*a</sup>    |
|            | Prebiótica 5%   | 86,68±0,60 <sup>ab</sup>  | 86,49±0,76 <sup>ab</sup> | 0,87±0,08 <sup>bc</sup>  | 0,42±0,02 <sup>b</sup>   | 0,002±0,000 <sup>a</sup>   | 0,006±0,005 <sup>bc</sup>   |
|            | Prebiótica 10%  | 90,54±1,59 <sup>a</sup>   | 90,08±1,58 <sup>a</sup>  | 0,61±0,02 <sup>c</sup>   | 0,28±0,05 <sup>*bc</sup> | 0,003±0,000 <sup>a</sup>   | 0,014±0,001 <sup>b</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 89,69±1,87 <sup>ab</sup>  | 87,68±1,85 <sup>ab</sup> | 1,54±0,12 <sup>*a</sup>  | 0,29±0,06 <sup>*bc</sup> | 0,037±0,005 <sup>a</sup>   | 0,051±0,002 <sup>ac</sup>   |
|            | Simbiótica 5%   | 87,40±1,29 <sup>ab</sup>  | 86,60±1,40 <sup>ab</sup> | 0,86±0,15 <sup>c</sup>   | 0,32±0,03 <sup>*bc</sup> | 0,015±0,007 <sup>a</sup>   | 0,022±0,011 <sup>bc</sup>   |
|            | Simbiótica 10%  | 94,74±1,77 <sup>*a</sup>  | 91,45±3,91 <sup>a</sup>  | 0,44±0,01 <sup>*c</sup>  | 0,14±0,04 <sup>*c</sup>  | 0,037±0,033 <sup>a</sup>   | 0,09±0,07 <sup>abc</sup>    |
| 18-20 días | AO4             | 57,42±0,79                | 54,63±0,99               | 1,45±0,07                | 16,56±0,54               | 0,14±0,02                  | 1,071±0,14                  |
|            | Control         | 81,92±1,46                | 78,41±0,57               | 0,71±0,01                | 0,85±0,14                | 0,046±0,005                | 0,16±0,036                  |
|            | Probiótica      | 78,33±2,54 <sup>d</sup>   | 77,16±2,56 <sup>b</sup>  | 0,96±0,15 <sup>a</sup>   | 0,78±0,10 <sup>a</sup>   | 0,018±0,008 <sup>c</sup>   | 0,044±0,02 <sup>*b</sup>    |
|            | Prebiótica 1,2% | 90,35±1,74 <sup>*ac</sup> | 84,29±1,94 <sup>ab</sup> | 0,78±0,05 <sup>abc</sup> | 0,40±0,07 <sup>*bc</sup> | 0,13±0,011 <sup>*a</sup>   | 0,25±0,008 <sup>*a</sup>    |
|            | Prebiótica 5%   | 84,93±1,53 <sup>bcd</sup> | 84,73±1,52 <sup>ab</sup> | 0,79±0,03 <sup>ab</sup>  | 0,61±0,04 <sup>ab</sup>  | 0,004±0,000 <sup>*c</sup>  | 0,008±0,000 <sup>*b</sup>   |
|            | Prebiótica 10%  | 91,13±1,13 <sup>*ab</sup> | 90,48±1,31 <sup>*a</sup> | 0,68±0,02 <sup>abc</sup> | 0,34±0,05 <sup>*bc</sup> | 0,007±0,003 <sup>*c</sup>  | 0,023±0,01 <sup>*b</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 87,53±0,65 <sup>ab</sup>  | 86,53±0,78 <sup>a</sup>  | 0,70±0,06 <sup>abc</sup> | 0,41±0,02 <sup>*bc</sup> | 0,021±0,008 <sup>bc</sup>  | 0,032±0,017 <sup>*b</sup>   |
|            | Simbiótica 5%   | 93,49±0,44 <sup>*ab</sup> | 92,61±0,27 <sup>*a</sup> | 0,34±0,04 <sup>bc</sup>  | 0,22±0,01 <sup>*c</sup>  | 0,024±0,008 <sup>bc</sup>  | 0,03±0,013 <sup>*b</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 95,06±0,98 <sup>*a</sup>  | 89,67±2,45 <sup>*a</sup> | 0,32±0,03 <sup>c</sup>   | 0,18±0,03 <sup>*c</sup>  | 0,053±0,008 <sup>b</sup>   | 0,19±0,045 <sup>ab</sup>    |
| 28-30 días | AO4             | 52,64±3,33                | 50,08±3,00               | 1,69±0,12                | 19,58±0,99               | 0,136±0,021                | 1,07±0,19                   |
|            | Control         | 76,63±1,78                | 72,00±1,53               | 0,66±0,09                | 1,32±0,14                | 0,046±0,012                | 0,26±0,008                  |
|            | Probiótica      | 76,95±2,03 <sup>d</sup>   | 71,80±3,17 <sup>b</sup>  | 0,76±0,07 <sup>ab</sup>  | 1,18±0,10 <sup>a</sup>   | 0,10±0,04 <sup>b</sup>     | 0,25±0,10 <sup>b</sup>      |
|            | Prebiótica 1,2% | 85,59±1,49 <sup>*ac</sup> | 81,33±1,25 <sup>*a</sup> | 0,60±0,03 <sup>ab</sup>  | 0,77±0,10 <sup>*bc</sup> | 0,075±0,044 <sup>b</sup>   | 0,21±0,12 <sup>b</sup>      |
|            | Prebiótica 5%   | 81,18±1,15 <sup>bcd</sup> | 80,99±1,15 <sup>*a</sup> | 0,79±0,05 <sup>a</sup>   | 1,08±0,05 <sup>ab</sup>  | 0,003±0,000 <sup>b</sup>   | 0,011±0,000 <sup>b</sup>    |
|            | Prebiótica 10%  | 89,85±0,89 <sup>*a</sup>  | 89,68±0,92 <sup>*a</sup> | 0,57±0,09 <sup>ac</sup>  | 0,60±0,06 <sup>*c</sup>  | 0,002±0,000 <sup>b</sup>   | 0,009±0,001 <sup>b</sup>    |
|            | Simbiótica 1,2% | 85,65±1,48 <sup>*ab</sup> | 63,54±0,57 <sup>bc</sup> | 0,54±0,02 <sup>bc</sup>  | 0,64±0,09 <sup>*c</sup>  | 0,42±0,034 <sup>*a</sup>   | 0,97±0,06 <sup>*a</sup>     |
|            | Simbiótica 5%   | 89,90±1,67 <sup>*a</sup>  | 60,03±3,66 <sup>*c</sup> | 0,31±0,04 <sup>*c</sup>  | 0,45±0,08 <sup>*c</sup>  | 0,50±0,11 <sup>*a</sup>    | 1,34±0,24 <sup>*ab</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 90,90±2,03 <sup>*a</sup>  | 90,69±2,05 <sup>*a</sup> | 0,23±0,04 <sup>*c</sup>  | 0,40±0,07 <sup>*c</sup>  | 0,002±0,000 <sup>b</sup>   | 0,009±0,001 <sup>b</sup>    |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-d</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

#### 4.4.3. Balance de fósforo

La **Tabla 44** muestra el balance mineral del P en tres periodos de tres días cada uno durante el tiempo en el que se les administró los diferentes tipos de dietas a las ratas. En el 1<sup>er</sup> periodo la AA de P de ninguno de los grupos problema mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a la del grupo control (93,13%). Tampoco fueron observadas diferencias entre los grupos problema, oscilando sus valores de 90,68 a 96,23%. En el 2<sup>o</sup> periodo, únicamente el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 10% mostró una AA significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (94,24%) a la del grupo alimentado con la dieta control (82,38%), debido a su menor excreción diaria de P en heces respecto al grupo control (5,86 mg/día). En el 3<sup>er</sup> periodo, los grupos alimentados con las dietas probiótica y prebióticas al 1,2 y 10% (85,82, 87,73 y 91,63%, respectivamente) fueron los que tuvieron una AA significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor a la del grupo control (79,04%), por presentar los dos últimos una excreción de P en heces inferior a la del grupo control (8,45 mg/día).

Debido a que las pérdidas por orina de P fueron más importantes que en el resto de minerales, los porcentajes de retención de P descendieron de forma considerable. Esta reducción fue más notoria en los grupos alimentados con las dietas simbióticas al 1,2 y 5% en todos los periodos. Así en el 1<sup>er</sup> periodo, la reducción fue de un 19,2 y 9,5%, respectivamente, en el 2<sup>o</sup> periodo de un 8 y 12,2%, respectivamente, y en el 3<sup>er</sup> periodo de un 16 y 17%, respectivamente. En cuanto a los valores de retención en el 1<sup>er</sup> periodo, los únicos grupos que mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (92,92%) fueron los grupos alimentados con las dietas simbióticas al 1,2 y 5% (77,07 y 81,17%, respectivamente) debido a las significativas ( $p < 0,05$ ) pérdidas de P por orina. En el 2<sup>o</sup> periodo, al igual que con la AA el único grupo con una retención significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la del grupo control (81,28%) fue el alimentado con la dieta prebiótica al 10% (92,70%), aunque no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los grupos alimentados con las otras dietas prebióticas y con la simbiótica al 10% (88,67, 85,52 y 86,66%, respectivamente). Por el contrario, los grupos con los porcentajes más bajos fueron los alimentados con las dietas probiótica y simbiótica al 5% (75,16 y 74,53%, respectivamente) al ser los dos grupos con mayores pérdidas de P por orina y día. En el 3<sup>er</sup> periodo, fueron únicamente los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 1,2 y 10% los que mostraron valores significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores (86,23 y 90,20%, respectivamente) al del grupo control (72,53%). Los grupos que presentaron los valores de retención más bajos fueron los alimentados con las dietas probiótica y simbióticas (desde 63,91% con la dieta simbiótica al 1,2% hasta 70,39% con la simbiótica al 10%) debido a su mayor excreción de P por orina.

Como conclusión al balance del P se puede señalar de nuevo los elevados porcentajes AA y retención encontrados en todos los grupos alimentados con fórmula infantil respecto al alimentado con la dieta AO4. También hay que destacar que en todos los grupos estos porcentajes fueron descendiendo conforme los animales iban siendo mayores. Al igual que

ocurrió con el Mg, el número de grupos con una AA y retención significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control fue siendo mayor conforme avanzaba el estudio. También se observó un efecto claro en la excreción urinaria de P en los grupos alimentados con las dietas simbióticas al 1,2 y 5%, que redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) los porcentajes de retención en el 1<sup>er</sup> periodo, y simbiótica 1,2% en el 3<sup>er</sup> periodo.

Los estudios sobre el efecto de los OND en la absorción de P son muy escasos. Ohta y col. (1993) observaron que la administración de un 5% FOS cc a la dieta de ratas produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la AA de P, mientras que los GOS y la rafinosa no mostraron diferencias con el control. En ratas de cuatro semanas de edad alimentadas con una dieta que contenía un 5% de FOS cc se obtuvo una AA de P del 90 y 95% cuando se realizó una infusión de Ca y Mg en el estómago y ciego, respectivamente (Ohta y col., 1997). Ohta y col. (1994a) describieron que la administración a ratas de dietas con elevado contenido de Ca (1.040 mg/100 g) produjo una reducción en la absorción de P (del orden del 20%). En nuestro estudio el efecto de la concentración de Ca de la dieta no fue determinante para modificar la absorción de P, ya que el nivel de Ca en la dieta empleada puede considerarse moderado (572 mg/ 100 g). Los valores de AA de P obtenidos en este estudio (1<sup>er</sup> periodo) coinciden con los descritos por Ohta y col. (1994a) (93%) cuando el contenido de Ca en la dieta es similar (520 mg/100 g).

Para finalizar el balance del P, se puede concluir que únicamente los grupos alimentados con las dietas probiótica, prebióticas al 1,2 y 10% mostraron una absorción de P significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor a la del grupo alimentado con la dieta control en alguno de los tres periodos de balance mineral. El grupo alimentado con fórmula probiótica no presentó un mayor efecto respecto a los grupos alimentados con fórmula prebiótica. Al igual que con los otros minerales, en ningún periodo se pudo establecer una relación dosis-efecto en cuanto al incremento de la concentración de 4'-GOS en la dieta y la absorción de P. El único grupo que mostró una AA y retención significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control en los últimos dos periodos fue el alimentado con la dieta prebiótica al 10%. Las dietas simbióticas no presentaron ninguna mejora en la absorción de P respecto a las dietas prebióticas.

**Tabla 44.** Balance mineral del fósforo

| Periodo    | Dietas          | Absorción aparente (%)     | Retención (%)              | Excreción fecal (mg/g)    | Excreción fecal (mg/día)  | Excreción urinaria (mg/mL) | Excreción urinaria (mg/día) |
|------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 8-10 días  | AO4             | 33,87±3,38                 | 33,11±3,47                 | 7,86±0,45                 | 69,51±5,44                | 0,17±0,030                 | 0,78±0,18                   |
|            | Control         | 93,13±0,55                 | 92,92±0,54                 | 2,97±0,07                 | 2,21±0,18                 | 0,02±0,007                 | 0,065±0,01                  |
|            | Probiótica      | 95,40±0,28 <sup>a</sup>    | 88,70±0,86 <sup>ab</sup>   | 2,85±0,17 <sup>bcd</sup>  | 1,14±0,06 <sup>*/a</sup>  | 0,83±0,064 <sup>*/c</sup>  | 1,65±0,19 <sup>*/bc</sup>   |
|            | Prebiótica 1,2% | 92,04±1,84 <sup>a</sup>    | 91,88±1,84 <sup>ab</sup>   | 3,11±0,09 <sup>c</sup>    | 1,44±0,35 <sup>a</sup>    | 0,071±0,003 <sup>e</sup>   | 0,028±0,01 <sup>d</sup>     |
|            | Prebiótica 5%   | 93,00±0,56 <sup>a</sup>    | 91,06±0,84 <sup>ab</sup>   | 3,01±0,16 <sup>bcd</sup>  | 1,47±0,10 <sup>a</sup>    | 0,12±0,017 <sup>de</sup>   | 0,41±0,084 <sup>bc</sup>    |
|            | Prebiótica 10%  | 95,95±0,64 <sup>a</sup>    | 94,21±0,53 <sup>a</sup>    | 1,71±0,04 <sup>*/d</sup>  | 0,79±0,14 <sup>*/a</sup>  | 0,085±0,002 <sup>de</sup>  | 0,34±0,03 <sup>bc</sup>     |
|            | Simbiótica 1,2% | 96,23±0,90 <sup>a</sup>    | 77,07±2,88 <sup>*/c</sup>  | 4,03±0,03 <sup>*/ab</sup> | 0,80±0,22 <sup>*/a</sup>  | 2,76±0,108 <sup>*/a</sup>  | 3,90±0,58 <sup>*/a</sup>    |
|            | Simbiótica 5%   | 90,68±1,89 <sup>a</sup>    | 81,17±4,04 <sup>*/bc</sup> | 4,91±0,18 <sup>*/a</sup>  | 1,90±0,28 <sup>a</sup>    | 1,56±0,157 <sup>*/b</sup>  | 1,96±0,51 <sup>*/b</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 93,23±2,34 <sup>a</sup>    | 88,87±2,98 <sup>abc</sup>  | 4,00±0,21 <sup>*/ac</sup> | 1,27±0,44 <sup>a</sup>    | 0,41±0,071 <sup>*/d</sup>  | 1,19±0,11 <sup>*/bcd</sup>  |
| 18-20 días | AO4             | 31,54±1,91                 | 25,01±6,00                 | 8,49±0,72                 | 97,31±10,77               | 0,15±0,001                 | 1,12±0,12                   |
|            | Control         | 82,38±4,39                 | 81,28±4,37                 | 4,28±0,61                 | 5,86±1,49                 | 0,11±0,008                 | 0,37±0,001                  |
|            | Probiótica      | 88,22±0,45 <sup>b</sup>    | 81,86±0,45 <sup>c</sup>    | 4,61±0,31 <sup>b</sup>    | 3,81±0,16 <sup>a</sup>    | 0,86±0,026 <sup>*/b</sup>  | 2,05±0,068 <sup>*/b</sup>   |
|            | Prebiótica 1,2% | 90,85±1,78 <sup>ab</sup>   | 88,67±1,65 <sup>ab</sup>   | 4,61±0,34 <sup>b</sup>    | 2,38±0,43 <sup>*/bc</sup> | 0,30±0,054 <sup>c</sup>    | 0,58±0,089 <sup>d</sup>     |
|            | Prebiótica 5%   | 87,47±1,53 <sup>b</sup>    | 85,52±1,64 <sup>bc</sup>   | 4,36±0,34 <sup>bc</sup>   | 3,36±0,32 <sup>ab</sup>   | 0,22±0,031 <sup>c</sup>    | 0,52±0,082 <sup>d</sup>     |
|            | Prebiótica 10%  | 94,24±1,04 <sup>*/a</sup>  | 92,70±1,02 <sup>*/a</sup>  | 2,86±0,27 <sup>c</sup>    | 1,46±0,31 <sup>*/c</sup>  | 0,11±0,011 <sup>cd</sup>   | 0,38±0,031 <sup>d</sup>     |
|            | Simbiótica 1,2% | 84,97±1,30 <sup>b</sup>    | 79,86±1,50 <sup>c</sup>    | 6,92±0,75 <sup>*/a</sup>  | 3,92±0,15 <sup>ab</sup>   | 1,25±0,34 <sup>*/b</sup>   | 1,33±0,15 <sup>*/c</sup>    |
|            | Simbiótica 5%   | 86,75±0,49 <sup>b</sup>    | 71,69±1,13 <sup>d</sup>    | 5,72±0,41 <sup>ab</sup>   | 3,71±0,14 <sup>ab</sup>   | 3,18±0,13 <sup>*/a</sup>   | 4,21±0,12 <sup>*/a</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 88,33±2,23 <sup>ab</sup>   | 86,66±2,42 <sup>abc</sup>  | 5,39±0,51 <sup>ab</sup>   | 3,04±0,48 <sup>ab</sup>   | 0,12±0,019 <sup>cd</sup>   | 0,43±0,04 <sup>d</sup>      |
| 28-30 días | AO4             | 40,56±1,21                 | 33,64±6,08                 | 7,87±0,69                 | 90,80±6,73                | 0,17±0,005                 | 1,33±0,06                   |
|            | Control         | 79,04±1,59                 | 72,53±1,75                 | 4,25±0,37                 | 8,45±0,46                 | 0,49±0,05                  | 2,64±0,43                   |
|            | Probiótica      | 85,82±1,32 <sup>*/ab</sup> | 67,90±1,52 <sup>c</sup>    | 4,15±0,38 <sup>ab</sup>   | 6,50±0,63 <sup>a</sup>    | 2,92±0,14 <sup>*/a</sup>   | 8,27±0,54 <sup>*/a</sup>    |
|            | Prebiótica 1,2% | 87,73±1,06 <sup>*/ab</sup> | 86,23±1,12 <sup>*/a</sup>  | 3,23±0,21 <sup>b</sup>    | 4,15±0,41 <sup>*/bc</sup> | 0,15±0,018 <sup>b</sup>    | 0,51±0,06 <sup>d</sup>      |
|            | Prebiótica 5%   | 82,61±0,81 <sup>b</sup>    | 78,08±1,49 <sup>b</sup>    | 4,87±0,29 <sup>ab</sup>   | 6,70±0,26 <sup>a</sup>    | 0,53±0,13 <sup>b</sup>     | 1,76±0,42 <sup>cd</sup>     |
|            | Prebiótica 10%  | 91,63±0,86 <sup>*/a</sup>  | 90,20±1,02 <sup>*/a</sup>  | 3,09±0,51 <sup>b</sup>    | 3,24±0,34 <sup>*/c</sup>  | 0,14±0,032 <sup>b</sup>    | 0,55±0,15 <sup>d</sup>      |
|            | Simbiótica 1,2% | 79,97±3,09 <sup>ab</sup>   | 63,91±4,38 <sup>*/c</sup>  | 5,82±0,96 <sup>a</sup>    | 6,82±1,18 <sup>ab</sup>   | 2,21±0,76 <sup>*/a</sup>   | 5,29±1,86 <sup>ab</sup>     |
|            | Simbiótica 5%   | 81,15±1,40 <sup>ab</sup>   | 64,15±3,57 <sup>c</sup>    | 4,92±0,45 <sup>ab</sup>   | 7,02±0,85 <sup>a</sup>    | 2,21±0,19 <sup>*/a</sup>   | 6,19±1,31 <sup>*/a</sup>    |
|            | Simbiótica 10%  | 75,76±3,26 <sup>ab</sup>   | 70,39±3,20 <sup>bc</sup>   | 4,39±0,49 <sup>ab</sup>   | 7,58±0,75 <sup>a</sup>    | 0,45±0,03 <sup>b</sup>     | 1,69±0,26 <sup>bcd</sup>    |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-e</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

#### 4.4.4. Balance de hierro

La **Tabla 45** muestra el balance mineral del Fe en tres periodos de tres días cada uno durante el tiempo en el que se les administró los diferentes tipos de dietas a las ratas. En el 1<sup>er</sup> periodo, la AA del Fe de todos los grupos problema fue superior a la del grupo control (50,78%), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en los grupos alimentados con las dietas probiótica, prebióticas y simbióticas al 1,2 y 10% (de 63,82 a 66,91%), sin embargo los grupos cuyas dietas contenían un 5% de 4'-GOS fueron los que mostraron una menor AA. Todos los grupos problema excretaron en heces cantidades significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores de Fe respecto al grupo control. En el 2<sup>o</sup> periodo, todos los grupos problema mostraron una AA de Fe superior a la del grupo control (31,12%) excepto el alimentado con la dieta simbiótica al 10% (27,21%). Únicamente los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% mostraron una AA significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (67,76 y 63,48%, respectivamente) al grupo control (31,12%). En este periodo, todos los grupos excretaron la misma cantidad de Fe por g de heces (entre 0,51 y 0,76 mg/g heces para los grupos alimentados con las dietas simbiótica y prebiótica al 1,2%, respectivamente) que el grupo control (0,53 mg/g heces), pero estas diferencias se hicieron significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores en todos los grupos cuando se tuvo en cuenta la excreción total de Fe al día. En el 3<sup>er</sup> periodo, todos los grupos problema presentaron una AA de Fe superior a la del grupo control (15,71%), y fueron los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 10% y simbiótica al 1,2 y 10% (36,71, 30,32 y 35,14%, respectivamente) los que mostraron una AA significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la del grupo control (15,71%). En este último periodo, todos los grupos excretaron la misma cantidad de Fe por g de heces (entre 0,38 y 0,54 mg/g heces para los grupos alimentados con las dietas simbiótica y prebiótica al 5%, respectivamente) que el grupo control (0,53 mg/g heces), excepto el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% (0,21 mg/g heces), pero de nuevo estas diferencias se hicieron significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores en todos los grupos cuando se tuvo en cuenta la excreción fecal total de Fe al día, excepto en el grupo alimentado con la dieta probiótica que no mostró diferencias (0,83 mg/día).

Debido a que las pérdidas de Fe por orina fueron muy pequeñas y estas no mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con las encontradas en el grupo control en ningún periodo, los porcentajes de retención de Fe no llegaron a tener más de un 1,2% de diferencia (en el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 10% en el 1<sup>er</sup> periodo) con el valor de AA en cualquier periodo. Así, las diferencias encontradas entre los grupos en cuanto al porcentaje de retención de Fe fueron las mismas que las de la AA de Fe, excepto en el 3<sup>er</sup> periodo dónde únicamente los grupos alimentados con las dietas que contienen un 10% de 4'-GOS fueron las que mostraron una retención significativamente ( $p < 0,05$ ) superior entorno al doble (36,47 y 34,89% con las dietas prebiótica y simbiótica al 10%, respectivamente) de la retención del grupo alimentado con la dieta control (15,30%).

Como conclusión al balance del Fe se puede señalar de nuevo los mayores porcentajes AA y retención encontrados en todos los grupos alimentados con fórmula infantil respecto al alimentado con la dieta AO4 pero sin ser tan elevados como en el Ca. Las diferencias encontradas entre el grupo control y los grupos problema fueron las mismas para la AA y la retención de Fe, puesto que las cantidades de Fe excretado por orina apenas tuvieron efecto en el cálculo de los balances. Los únicos grupos que mostraron una AA y retención significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a las del grupo control en los tres periodos fueron los alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 10%. Las diferencias en los valores de AA en todos los periodos y grupos respecto al grupo control se debieron a una menor excreción de Fe en las heces (en los grupos ya comentados anteriormente) causada por la excreción de un menor volumen fecal. Hay que destacar que en todos los grupos estos porcentajes fueron descendiendo con el tiempo puesto que se observó un menor número de grupos problema con valores significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores al grupo control. Por otra parte, no fue observada una relación clara dosis-efecto ni en la AA ni en la retención de este mineral.

Existen pocos datos en la bibliografía científica que evalúen el efecto de los GOS en la absorción de Fe. No obstante, otros autores han empleado OND diferentes a los GOS en la evaluación del balance del Fe. Así, Delzenne y col. (1995) encontraron en ratas jóvenes alimentadas con una dieta con 7,8 mg/100 g de Fe y con inulina u oligofruktosa al 10% durante 26 días, una retención de Fe del 34%. Ohta y col. (1995b) en ratas anémicas recién destetadas, alimentadas con FOS cc al 5% y una dieta baja (1,5 mg/100 g) o normal en Fe (3,0 mg/100 g), observaron una AA de Fe significativamente ( $p < 0,05$ ) menor en la dieta baja en Fe (46,3%) que en la de contenido normal en Fe (54,4%) sin estar afectados los balances del Ca y del Mg. Más recientemente, Lopez y col. (1998) en un estudio con ratas alimentadas con almidón resistente, observaron que el balance del Fe aumentó significativamente con una AA del 54% con almidón resistente respecto al control (45%).

Como puede observarse al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los descritos anteriormente, la AA y retención de Fe debida a el 4'-GOS es menor que para otros OND (inulina, oligofruktosa, FOS cc), debido entre otros motivos a las diferentes condiciones de evaluación del balance mineral, ya que en estos estudios las ratas parten de condiciones anémicas, por lo que el efecto de los OND es más intenso que cuando las condiciones fisiológicas son normales, como ocurre en nuestro estudio. También se han de tener en cuenta los posibles productos de la reacción de Maillard (lisinoalanina y lactulosa) que se pueden originar durante el procesado tecnológico de las fórmulas infantiles (Sarriá y col., 2000). Estos productos tienen el potencial de interactuar con varios minerales y elementos traza incluyendo al Fe (Sarriá y Vaquero, 2001) formando complejos insolubles que disminuyen su biodisponibilidad. Además, como consecuencia del daño proteico debido a los procesos térmicos se podrían perder propiedades asociadas con los mecanismos de absorción mineral (Pérez-Llamas y col., 1996).

Para concluir la discusión de los resultados obtenidos en el balance del Fe, excepto el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 5%, todos los grupos problema presentaron una AA y retención de Fe significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la del grupo alimentado con dieta control en alguno de los periodos. El efecto de las dietas prebióticas fue mayor que el de la dieta probiótica, sin embargo, la adición de diferentes concentraciones de 4'-GOS a la dieta no mostró una clara tendencia dosis-efecto. La incorporación de los probióticos a la dieta prebiótica dando lugar a las dietas simbióticas tampoco mejoró la absorción de Fe respecto a las primeras. Los grupos alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 5 y 10% fueron los más eficaces al mostrar una AA y retención de Fe significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la grupo control durante los tres periodos de balance.

**Tabla 45.** Balance mineral del hierro

| Periodo    | Dietas          | Absorción aparente (%)     | Retención (%)              | Excreción fecal (mg/g)    | Excreción fecal (mg/día)  | Excreción urinaria (mg/mL) | Excreción urinaria (mg/día) |
|------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 8-10 días  | AO4             | 20,77±4,74                 | 20,19±4,76                 | 0,60±0,05                 | 4,83±0,11                 | 1,33±0,16                  | 5,70±0,32                   |
|            | Control         | 50,78±2,94                 | 50,56±2,95                 | 0,63±0,06                 | 0,44±0,03                 | 0,66±0,14                  | 2,16±0,45                   |
|            | Probiótica      | 63,98±0,54 <sup>*/ac</sup> | 63,85±0,55 <sup>*/ab</sup> | 0,58±0,01 <sup>a</sup>    | 0,26±0,02 <sup>*/a</sup>  | 0,60±0,22 <sup>a</sup>     | 1,28±0,51 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 1,2% | 65,15±2,43 <sup>*/ab</sup> | 64,92±2,49 <sup>*/ab</sup> | 0,51±0,08 <sup>*/ab</sup> | 0,18±0,02 <sup>*/bc</sup> | 0,56±0,088 <sup>a</sup>    | 2,30±0,61 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 5%   | 56,69±1,44 <sup>bc</sup>   | 56,42±1,46 <sup>bc</sup>   | 0,57±0,01 <sup>a</sup>    | 0,27±0,01 <sup>*/a</sup>  | 0,86±0,19 <sup>a</sup>     | 2,70±0,44 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 10%  | 66,91±0,26 <sup>*/a</sup>  | 66,66±0,28 <sup>*/a</sup>  | 0,47±0,02 <sup>*/ab</sup> | 0,17±0,01 <sup>*/c</sup>  | 0,62±0,03 <sup>a</sup>     | 2,48±0,27 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 1,2% | 63,82±3,17 <sup>*/ac</sup> | 63,60±3,17 <sup>*/ab</sup> | 0,64±0,01 <sup>a</sup>    | 0,16±0,03 <sup>*/c</sup>  | 0,16±0,22 <sup>a</sup>     | 2,17±0,067 <sup>a</sup>     |
|            | Simbiótica 5%   | 55,98±2,00 <sup>c</sup>    | 55,08±2,41 <sup>c</sup>    | 0,40±0,03 <sup>*/b</sup>  | 0,16±0,01 <sup>*/c</sup>  | 6,20±4,83 <sup>a</sup>     | 8,98±7,63 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 10%  | 66,02±0,75 <sup>*/a</sup>  | 64,83±0,96 <sup>*/ab</sup> | 0,58±0,02 <sup>a</sup>    | 0,24±0,05 <sup>*/ab</sup> | 240±50 <sup>a</sup>        | 689±61 <sup>a</sup>         |
| 18-20 días | AO4             | 23,68±1,62                 | 21,12±3,50                 | 0,53±0,02                 | 6,02±0,31                 | 1095±95,8                  | 8104±834                    |
|            | Control         | 31,12±3,70                 | 30,85±3,67                 | 0,59±0,04                 | 0,68±0,06                 | 0,86±0,14 <sup>a</sup>     | 2,73±0,52                   |
|            | Probiótica      | 32,18±2,80 <sup>cb</sup>   | 32,00±2,79 <sup>cb</sup>   | 0,55±0,02 <sup>a</sup>    | 0,46±0,03 <sup>*/ab</sup> | 0,76±0,053 <sup>a</sup>    | 1,81±0,11 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 1,2% | 45,09±1,54 <sup>*/bc</sup> | 44,78±2,17 <sup>*/bc</sup> | 0,76±0,06 <sup>a</sup>    | 0,40±0,01 <sup>*/a</sup>  | 1,43±0,16 <sup>a</sup>     | 2,81±0,25 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 5%   | 67,76±5,19 <sup>*/a</sup>  | 67,52±5,19 <sup>*/a</sup>  | 0,48±0,17 <sup>a</sup>    | 0,35±0,12 <sup>*/ab</sup> | 1,40±0,29 <sup>a</sup>     | 3,16±0,53 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 10%  | 63,48±0,80 <sup>*/a</sup>  | 63,24±1,51 <sup>*/a</sup>  | 0,62±0,02 <sup>a</sup>    | 0,29±0,07 <sup>*/b</sup>  | 0,71±0,12 <sup>a</sup>     | 2,71±0,72 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 1,2% | 40,44±2,44 <sup>bcd</sup>  | 40,11±2,53 <sup>bcd</sup>  | 0,51±0,01 <sup>a</sup>    | 0,32±0,03 <sup>*/ab</sup> | 3,83±2,43 <sup>a</sup>     | 3,28±1,11 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 5%   | 27,21±4,05 <sup>d</sup>    | 26,43±4,47 <sup>d</sup>    | 0,61±0,05 <sup>a</sup>    | 0,39±0,02 <sup>*/ab</sup> | 6,01±3,75 <sup>a</sup>     | 7,78±5,77 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 10%  | 53,28±2,91 <sup>*/ab</sup> | 52,91±2,83 <sup>*/ab</sup> | 0,68±0,09 <sup>a</sup>    | 0,45±0,02 <sup>*/a</sup>  | 602±110 <sup>a</sup>       | 2160±429 <sup>a</sup>       |
| 28-30 días | AO4             | 14,44±3,80                 | 13,87±3,82                 | 0,63±0,02                 | 7,32±0,41                 | 788±131                    | 6025±664                    |
|            | Control         | 15,71±0,81                 | 15,30±1,28                 | 0,53±0,02                 | 1,04±0,06                 | 0,58±0,069                 | 3,37±1,00                   |
|            | Probiótica      | 17,09±2,98 <sup>b</sup>    | 16,15±3,36 <sup>b</sup>    | 0,51±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,83±0,03 <sup>a</sup>    | 3,47±2,57 <sup>a</sup>     | 9,34±6,26 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 1,2% | 22,27±2,63 <sup>a</sup>    | 22,15±2,58 <sup>ab</sup>   | 0,53±0,05 <sup>ab</sup>   | 0,77±0,08 <sup>*/ab</sup> | 0,32±0,22 <sup>a</sup>     | 1,18±0,73 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 5%   | 24,23±5,19 <sup>ab</sup>   | 23,41±5,70 <sup>ab</sup>   | 0,54±0,03 <sup>a</sup>    | 0,78±0,08 <sup>*/ab</sup> | 0,21±1,28 <sup>a</sup>     | 6,57±3,69 <sup>a</sup>      |
|            | Prebiótica 10%  | 36,71±2,97 <sup>*/a</sup>  | 36,47±3,00 <sup>*/a</sup>  | 0,55±0,07 <sup>a</sup>    | 0,60±0,06 <sup>*/ac</sup> | 0,61±0,06 <sup>a</sup>     | 2,41±0,50 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 1,2% | 30,32±3,90 <sup>*/ab</sup> | 29,44±3,98 <sup>ab</sup>   | 0,21±0,01 <sup>*/b</sup>  | 0,48±0,05 <sup>*/c</sup>  | 0,75±0,18 <sup>a</sup>     | 1,73±0,20 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 5%   | 25,14±2,00 <sup>ab</sup>   | 24,36±2,24 <sup>ab</sup>   | 0,38±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,53±0,01 <sup>*/bc</sup> | 2,60±0,79 <sup>a</sup>     | 7,78±3,53 <sup>a</sup>      |
|            | Simbiótica 10%  | 35,14±2,99 <sup>*/a</sup>  | 34,89±2,98 <sup>*/ab</sup> | 0,45±0,08 <sup>ab</sup>   | 0,75±0,01 <sup>*/ac</sup> | 6,64±0,07 <sup>a</sup>     | 2,52±0,55 <sup>a</sup>      |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-d</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna para cada uno de los 3 periodos indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

## 4.5. Efecto sobre el ciego y el colon de las ratas

### 4.5.1. Peso y valor de pH del ciego y del colon y sus contenidos

En la **Tabla 46** se muestran las siguientes variables medidas en el ciego: el peso total del ciego y de la pared del mismo tras extraer su contenido, el pH y peso del contenido, así como los pesos de la fase sólida y líquida del mismo tras su centrifugación. Como muestra la tabla, la incorporación a la dieta de probióticos y/o prebióticos no modificó significativamente ( $p < 0,05$ ) el peso total del ciego ni el de su contenido. La pared del ciego se vio afectada en el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 10%, en el que se observó un aumento de peso (1,58 g), lo que representa un incremento de 1/3 del peso de la pared del grupo control. A pesar de no observar diferencias significativas en relación al grupo control, los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 10% y simbióticas al 5 y 10% fueron los que presentaron un peso total, de la pared y del contenido del ciego superior entre los grupos problema. En cuanto al pH del contenido del ciego, fueron los grupos alimentados con las dietas simbióticas los que mostraron un pH significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajo (5,14, 5,12 y 5,13, respectivamente) que el grupo control (5,60). De las dos fases en las que se divide el contenido del ciego tras su centrifugación, el peso de la fase sólida no tuvo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los grupos problema respecto al grupo control (0,29 g). Sin embargo, los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 10% y simbióticas mostraron un peso significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor de la fase líquida (de 3,28 g con la dieta simbiótica al 1,2% a 3,70 g con la dieta prebiótica al 10%) en comparación con el del grupo alimentado con la dieta control (2,91 g).

**Tabla 46.** Peso y pH del ciego y su contenido en ratas

| Dietas          | Peso total (g)          | Peso pared (g)           | Peso contenido (g)      | pH                       | Peso fase líquida (g)    | Peso fase sólida (g)   |
|-----------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| AO4             | 5,94±0,92               | 1,20±0,17                | 4,74±0,80               | 5,95±0,09                | 4,12±0,02                | 0,62±0,02              |
| Control         | 4,24±0,53               | 1,02±0,08                | 3,21±0,49               | 5,60±0,09                | 2,91±0,04                | 0,29±0,03              |
| Probiótica      | 4,22±0,18 <sup>ab</sup> | 1,04±0,05 <sup>b</sup>   | 3,18±0,16 <sup>ab</sup> | 5,67±0,07 <sup>a</sup>   | 2,88±0,02 <sup>c</sup>   | 0,30±0,02 <sup>a</sup> |
| Prebiótica 1,2% | 3,51±0,38 <sup>b</sup>  | 1,00±0,11 <sup>b</sup>   | 2,50±0,30 <sup>b</sup>  | 5,50±0,09 <sup>ab</sup>  | 2,28±0,03 <sup>*/d</sup> | 0,22±0,03 <sup>a</sup> |
| Prebiótica 5%   | 3,38±0,39 <sup>b</sup>  | 0,99±0,05 <sup>b</sup>   | 2,40±0,36 <sup>b</sup>  | 5,40±0,14 <sup>ab</sup>  | 2,22±0,01 <sup>*/d</sup> | 0,17±0,01 <sup>a</sup> |
| Prebiótica 10%  | 5,52±0,37 <sup>a</sup>  | 1,58±0,27 <sup>*/a</sup> | 3,94±0,35 <sup>ab</sup> | 5,42±0,09 <sup>ab</sup>  | 3,70±0,06 <sup>*/a</sup> | 0,23±0,06 <sup>a</sup> |
| Simbiótica 1,2% | 4,51±0,33 <sup>ab</sup> | 0,95±0,10 <sup>b</sup>   | 3,56±0,36 <sup>ab</sup> | 5,14±0,06 <sup>*/b</sup> | 3,28±0,06 <sup>*/b</sup> | 0,25±0,06 <sup>a</sup> |
| Simbiótica 5%   | 5,39±0,35 <sup>a</sup>  | 1,36±0,02 <sup>ab</sup>  | 4,03±0,34 <sup>a</sup>  | 5,12±0,08 <sup>*/b</sup> | 3,69±0,06 <sup>*/a</sup> | 0,34±0,06 <sup>a</sup> |
| Simbiótica 10%  | 5,40±0,78 <sup>a</sup>  | 1,37±0,09 <sup>ab</sup>  | 4,03±0,74 <sup>ab</sup> | 5,13±0,07 <sup>*/b</sup> | 3,67±0,01 <sup>*/a</sup> | 0,36±0,01 <sup>a</sup> |

Cada valor es la media±error típico, n=6

<sup>\*</sup> La presencia de asteriscos dentro de la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-d</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

En la **Tabla 47** se muestra el peso total del colon y de la pared del mismo tras extraer su contenido, el pH y el peso del contenido del colon, así como los pesos de la fase sólida y líquida en la que se divide el contenido del colon después de su centrifugación. Al igual que

sucedió con el ciego, la incorporación a la dieta de probióticos y/o prebióticos no modificó significativamente ( $p < 0,05$ ) el peso total del colon ni el de su contenido respecto al grupo control. Sin embargo, el peso de la pared del colon en los grupos alimentados con dieta simbiótica al 1,2 y 5% mostraron los valores más bajos (0,49 y 0,61 g, respectivamente). El grupo alimentado con la dieta prebiótica al 10% fue el que mostró un mayor peso total y de la pared del colon (1,51 y 0,85 g, respectivamente), y el alimentado con la dieta probiótica un mayor peso total y del contenido del colon (1,57 y 0,84 g, respectivamente) entre los grupos problema. En cuanto al pH del contenido del colon, al igual que ocurrió con el ciego, los grupos alimentados con las dietas simbióticas fueron los que mostraron un pH más bajo (5,25, 5,21 y 5,26, respectivamente) junto al alimentado con la dieta prebiótica al 5% (5,36), difiriendo todos ellos significativamente ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (5,77). Excepto la fase sólida del grupo alimentado con dieta simbiótica al 10% (0,33 g), ningún grupo problema mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el peso de las fases sólida y líquida del contenido del colon con el grupo control (0,17 y 0,41 g, respectivamente).

**Tabla 47.** Peso y pH del colon y su contenido en ratas

| Dietas          | Peso total (g)          | Peso pared (g)            | Peso contenido (g)     | pH                       | Peso fase líquida (g)   | Peso fase sólida (g)     |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| AO4             | 3,83±0,45               | 1,55±0,07                 | 2,28±0,45              | 5,98±0,06                | 1,74±0,10               | 0,54±0,10                |
| Control         | 1,40±0,15               | 0,85±0,06                 | 0,58±0,10              | 5,77±0,15                | 0,41±0,01               | 0,17±0,01                |
| Probiótica      | 1,57±0,11 <sup>a</sup>  | 0,72±0,03 <sup>ab</sup>   | 0,84±0,10 <sup>a</sup> | 5,51±0,12 <sup>a</sup>   | 0,63±0,03 <sup>a</sup>  | 0,21±0,03 <sup>a</sup>   |
| Prebiótica 1,2% | 1,42±0,11 <sup>ab</sup> | 0,79±0,08 <sup>ab</sup>   | 0,63±0,07 <sup>a</sup> | 5,53±0,15 <sup>a</sup>   | 0,49±0,02 <sup>ab</sup> | 0,13±0,03 <sup>a</sup>   |
| Prebiótica 5%   | 1,42±0,10 <sup>ab</sup> | 0,66±0,03 <sup>abc</sup>  | 0,76±0,08 <sup>a</sup> | 5,36±0,07 <sup>a/a</sup> | 0,54±0,03 <sup>ab</sup> | 0,22±0,02 <sup>a</sup>   |
| Prebiótica 10%  | 1,51±0,16 <sup>a</sup>  | 0,85±0,07 <sup>a</sup>    | 0,69±0,14 <sup>a</sup> | 5,42±0,08 <sup>a</sup>   | 0,52±0,07 <sup>ab</sup> | 0,16±0,07 <sup>a</sup>   |
| Simbiótica 1,2% | 0,93±0,10 <sup>b</sup>  | 0,49±0,05 <sup>a/c</sup>  | 0,43±0,07 <sup>a</sup> | 5,25±0,04 <sup>a/a</sup> | 0,29±0,03 <sup>b</sup>  | 0,13±0,03 <sup>a</sup>   |
| Simbiótica 5%   | 1,25±0,11 <sup>ab</sup> | 0,61±0,04 <sup>a/bc</sup> | 0,64±0,08 <sup>a</sup> | 5,21±0,07 <sup>a/a</sup> | 0,42±0,06 <sup>ab</sup> | 0,22±0,06 <sup>a</sup>   |
| Simbiótica 10%  | 1,44±0,18 <sup>ab</sup> | 0,70±0,03 <sup>ac</sup>   | 0,74±0,17 <sup>a</sup> | 5,26±0,08 <sup>a/a</sup> | 0,41±0,13 <sup>ab</sup> | 0,33±0,13 <sup>a/a</sup> |

Cada valor es la media±error típico, n=6

<sup>a</sup> La presencia de asteriscos dentro de la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a,c</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

Del análisis de las dos tablas anteriores podemos concluir que únicamente el grupo alimentado con dieta prebiótica la 10% tuvo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el peso de la pared del ciego y que las dietas simbióticas redujeron significativamente ( $p < 0,05$ ) el pH de los contenidos del ciego y colon respecto al grupo control. En cuanto a la fase sólida del contenido del ciego y colon, no hubo ningún efecto, y sobre la fase líquida del ciego, fueron los grupos alimentados con las dietas simbióticas y prebiótica al 10% las que incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) el peso de esta fase, que es donde se encuentran los minerales dispuestos para ser absorbidos por las células epiteliales del intestino grueso.

Todos los estudios coinciden en señalar una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el pH del contenido del ciego como consecuencia de la administración de OND a la dieta. En este sentido, Ohta y col. (1993) observaron que la administración de un 5% de GOS, rafinosa o FOS cc a la dieta de ratas disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) los valores del pH del contenido del

ciego (5,62, 5,54 y 5,24, respectivamente) frente al grupo control (6,88). Junto al tipo de OND interviene también la concentración de OND administrada y la concentración de Ca en la dieta. Así Chonan y Watanuki (1995) encontraron que el pH del contenido del ciego en las ratas fue de 5,6 cuando se les administró un 5% de TOS y de 5,3 con un 10% de TOS. Respecto al contenido en Ca, estos mismos autores (Chonan y Watanuki, 1996) describieron que el consumo de un 5% de 6'-GOS en una dieta con bajo contenido de Ca (215 mg Ca/100 g) dio lugar a un menor pH del contenido del ciego (5,80) en comparación al pH alcanzado (6,04) por el grupo alimentado con una dieta con contenido normal en Ca (2.150 mg Ca/100g). Rémésy y col. (1993) en ratas alimentadas con una dieta con 300 mg/100 g y otra con 800 mg/100 g de Ca enriquecidas con inulina al 15%, también encontraron que el pH del grupo alimentado con la dieta con menor cantidad de Ca fue significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior (5,30) al otro grupo (5,9).

Lopez y col. (1998) no observaron diferencias significativas en el peso de la pared del ciego utilizando como fuente de hidratos de carbono el almidón resistente y no resistente. No obstante, empleando otro tipo de hidrato de carbono resistente se han observado otros resultados como los descritos por Chonan y col. (2001) que observaron que la alimentación de ratas con una dieta con un 5% de 4'-GOS produjo un aumento del peso total del ciego y de su pared. Sin embargo, en un estudio previo Chonan y Watanuki (1995) encontraron un mayor peso significativo de la pared del ciego sólo en el grupo alimentado con un 10% de TOS, como ocurre en nuestro trabajo empleando 4'-GOS como OND.

Al igual que en nuestro estudio y empleando otros OND, Campbell y col. (1997) tampoco encontraron diferencias significativas con el peso total y de la pared del colon respecto al grupo control en las ratas alimentadas con dietas con un 6% de celulosa, FOS cc, oligofruktosa o XOS.

El empleo de probióticos para evaluar sus efectos sobre el ciego y el colon y sobre sus contenidos está poco estudiado. Aún así, Djouzi y col. (1997) describieron que la administración de una dieta con probióticos provocó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el pH del contenido cecal en ratas libres de gérmenes alimentadas con una dieta con un 30% de leche fermentada con *L. casei*. Sin embargo y al igual que en nuestro estudio no encontraron cambios significativos en el peso del ciego tras cuatro semanas de estudio.

En cuanto al pH del contenido del colon no suele ser medido puesto que a esta zona se le da una menor importancia desde el punto de vista fermentativo, sin embargo Ohta y col. (1994b) en un estudio con ratas laparotomizadas y alimentadas con una dieta con un 5% de FOS cc, describieron que el pH del contenido del ciego y colon fue de 5,36 y 5,7 respectivamente. Al igual que en nuestro estudio, el pH del colon fue mayor que el encontrado en el ciego, debido posiblemente a que a diferencia del hombre, la rata es una especie donde la fermentación se produce principalmente en el ciego (Campbell y col., 1997).

Nosotros encontramos un aumento significativo en el peso de la fase líquida del contenido del ciego en los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 10% y las dietas

simbióticas. Este hallazgo también ha sido descrito por otros autores mediante el empleo de almidón resistente (Schultz y col., 1993), arabinosilanos y goma guar (Lu y col., 2000) y TGOS (Chonan y Watanuki, 1995). Se ha descrito que este hecho podría tener un efecto directo en la absorción mineral y más concretamente en la de Ca, debido a que este fluido debe aumentar la absorción pasiva del calcio mediante el incremento de la permeabilidad de la unión intercelular entre los enterocitos (Bronner, 1987).

Como conclusión del efecto de los probióticos y prebióticos sobre los parámetros medidos en el ciego y colon de las ratas, los grupos alimentados con las dietas simbióticas fueron los que presentaron un pH del contenido del ciego significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al del grupo control y un peso de la fase líquida, junto a la dieta prebiótica al 10% en este último parámetro, significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor a la del grupo control. En el colon los grupos alimentados con las dietas simbióticas junto al alimentado con la dieta prebiótica al 5%, fueron nuevamente los que mostraron un pH del contenido del colon significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior al del grupo control.

#### **4.5.2. Distribución mineral en la fase líquida y sólida del contenido del ciego y del colon**

En la **Tabla 48** se muestra la distribución mineral (Ca, Mg, P y Fe) en las fases líquida y sólida del contenido del ciego y del colon expresados en mg de mineral/contenido. En todos los minerales se observó una mayor presencia de los mismos en la fase sólida respecto a la fase líquida. La concentración mineral de la fase líquida, donde se encuentran los minerales en su forma soluble, tanto en el contenido del ciego como del colon de forma general no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la del grupo alimentado con la dieta control. Únicamente en la fase líquida del contenido del ciego la concentración de Fe de los grupos alimentados con las dietas prebiótica y simbiótica al 10% fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (0,102 y 0,07 mg Fe, respectivamente) a la del grupo control (0,024 mg Fe).

Prácticamente todos los grupos problema presentaron un porcentaje mineral en la fase líquida del ciego sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en comparación con el del grupo control. Sin embargo y como era de esperar, el porcentaje de Fe en la fase líquida del contenido del colon en los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 5 y 10% (13,66 y 15,31%, respectivamente) fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control (5,15%). Además, el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 5% presentó un porcentaje de Mg en la fase líquida del ciego (95,50%) significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor al del grupo control (59,22%). Los mayores porcentajes se observaron en los minerales Ca y Mg, sugiriendo que en el contenido del ciego se solubilizó una importante cantidad de estos minerales. En cuanto al colon, el porcentaje de mineral solubilizado fue menor para el Ca y Mg, pero algo mayor para el Fe y P, sugiriendo que estos dos minerales se puedan absorber en mayor medida a partir del contenido del colon. En cualquier caso y como ocurría en el ciego fueron muy escasos los grupos

problema que presentaron un porcentaje mineral significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al encontrado en el grupo alimentado con la dieta control. Solamente el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 10% presentó un porcentaje de Ca en la fase líquida del contenido del colon significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (61,66%) al del grupo control (10,86%). Por último destacar tanto en el ciego como en el colon el escaso porcentaje de P en la fase líquida en comparación al resto de minerales, posiblemente debido a que se encuentre formando algún tipo de complejo (Brink y col., 1992) que impida su correcta medición, puesto que la absorción intestinal de este mineral como se ha descrito anteriormente es bastante importante.

Ohta y col. (1995b), observaron que la concentración de Fe en la fase líquida del contenido del ciego fue significativamente mayor en el grupo de ratas alimentado con un 5% de FOS cc que en el grupo control, y como en nuestro estudio, tampoco se observaron diferencias en el contenido de Ca y Mg en la fase líquida del ciego. El Fe fue el único mineral que mostró un porcentaje en la fase líquida del ciego significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al del control en los grupos alimentados con dieta prebiótica 5 y 10%, sin que existieran diferencias con el Ca, Mg y P respecto al grupo control salvo en el grupo alimentado con la dieta prebiótica y simbiótica al 5% para el Mg. También se ha observado que la concentración de mineral en la dieta influye sobre la concentración de ese mineral en la fase líquida del contenido del ciego. Así pues, Younes y col. (1996) encontraron que en ratas alimentadas con almidón resistente el porcentaje de Ca soluble presente en el contenido del ciego fue de un 49% cuando la dieta contenía una concentración baja de Ca (250 mg/100 g), frente a un 16% cuando el contenido de Ca en la dieta fue mayor (750 mg/100 g). En nuestro estudio, aunque la cantidad de Ca en la dieta fue intermedia (572 mg/100 g) a la empleada por Younes y col., obtuvimos unos porcentajes más similares a los del grupo alimentado con una menor cantidad de Ca.

**Tabla 48.** Distribución de los minerales (mg/contenido) en las fases líquida y sólida del contenido del ciego y del colon

|                                | AO4         | Control     | Probiótica               | Prebiótica 1,2%           | Prebiótica 5%              | Prebiótica 10%             | Simbiótica 1,2%           | Simbiótica 5%              | Simbiótica 10%              |
|--------------------------------|-------------|-------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>CIEGO</b>                   |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| Calcio                         |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 14,80±1,32  | 9,95±2,13   | 11,75±0,95 <sup>a</sup>  | 7,12±2,75 <sup>ab</sup>   | 5,79±0,27 <sup>b</sup>     | 5,50±0,37 <sup>b</sup>     | 4,59±0,93 <sup>b</sup>    | 9,09±0,39 <sup>ab</sup>    | 6,72±0,75 <sup>ab</sup>     |
| En la fase líquida             | 2,20±0,02   | 2,68±0,610  | 1,20±0,06 <sup>a</sup>   | 2,12±0,03 <sup>a</sup>    | 3,57±0,45 <sup>a</sup>     | 2,55±0,59 <sup>a</sup>     | 2,64±0,99 <sup>a</sup>    | 3,50±0,97 <sup>a</sup>     | 3,38±0,31 <sup>a</sup>      |
| % en fase líquida <sup>o</sup> | 13,08±0,89  | 21,23±1,06  | 9,33±0,82 <sup>b</sup>   | 27,66±8,26 <sup>ab</sup>  | 37,92±3,19 <sup>a</sup>    | 30,94±4,44 <sup>ab</sup>   | 37,38±6,95 <sup>ab</sup>  | 26,68±5,21 <sup>ab</sup>   | 33,67±2,60 <sup>ab</sup>    |
| Magnesio                       |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 1,07±0,10   | 0,27±0,03   | 0,19±0,01 <sup>a</sup>   | 0,16±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,02±0,00 <sup>b</sup>     | 0,20±0,01 <sup>*/a</sup>   | 0,36±0,03 <sup>*/a</sup>  | 0,16±0,02 <sup>ab</sup>    | 0,18±0,03 <sup>ab</sup>     |
| En la fase líquida             | 1,36±0,19   | 0,43±0,12   | 0,34±0,02 <sup>a</sup>   | 0,47±0,14 <sup>a</sup>    | 0,47±0,06 <sup>a</sup>     | 0,33±0,11 <sup>a</sup>     | 0,52±0,14 <sup>a</sup>    | 0,68±0,15 <sup>a</sup>     | 0,60±0,06 <sup>a</sup>      |
| % en fase líquida              | 55,69±2,57  | 59,22±4,78  | 64,44±1,06 <sup>bc</sup> | 75,24±5,59 <sup>abc</sup> | 95,50±0,34 <sup>*/a</sup>  | 60,12±5,32 <sup>bc</sup>   | 56,90±6,63 <sup>c</sup>   | 79,14±4,80 <sup>*/ab</sup> | 76,66±1,61 <sup>abc</sup>   |
| Fósforo                        |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 9,62±0,55   | 2,00±0,48   | 2,63±0,35 <sup>a</sup>   | 2,68±0,96 <sup>a</sup>    | 1,88±0,15 <sup>a</sup>     | 1,74±0,17 <sup>a</sup>     | 1,54±0,30 <sup>a</sup>    | 2,94±0,24 <sup>a</sup>     | 2,60±0,40 <sup>a</sup>      |
| En la fase líquida             | 0,050±0,001 | 0,041±0,005 | 0,044±0,001 <sup>a</sup> | 0,061±0,022 <sup>a</sup>  | 0,033±0,004 <sup>a</sup>   | 0,048±0,005 <sup>a</sup>   | 0,033±0,009 <sup>a</sup>  | 0,041±0,004 <sup>a</sup>   | 0,042±0,004 <sup>a</sup>    |
| % en fase líquida              | 0,52±0,04   | 2,21±0,41   | 1,73±0,25 <sup>ab</sup>  | 2,19±0,20 <sup>ab</sup>   | 1,71±0,09 <sup>ab</sup>    | 2,72±0,40 <sup>a</sup>     | 2,02±0,31 <sup>ab</sup>   | 1,40±0,23 <sup>b</sup>     | 1,63±0,25 <sup>ab</sup>     |
| Hierro                         |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 1,08±0,08   | 0,42±0,05   | 0,33±0,04 <sup>c</sup>   | 0,29±0,05 <sup>c</sup>    | 0,24±0,02 <sup>c</sup>     | 0,58±0,07 <sup>ab</sup>    | 0,21±0,02 <sup>*/c</sup>  | 0,43±0,01 <sup>abc</sup>   | 0,64±0,08 <sup>*/a</sup>    |
| En la fase líquida             | 0,022±0,006 | 0,024±0,007 | 0,023±0,005 <sup>c</sup> | 0,026±0,008 <sup>c</sup>  | 0,038±0,005 <sup>bc</sup>  | 0,102±0,002 <sup>*/a</sup> | 0,027±0,002 <sup>c</sup>  | 0,014±0,008 <sup>c</sup>   | 0,070±0,013 <sup>*/ab</sup> |
| % en fase líquida              | 2,11±0,76   | 5,15±0,96   | 6,58±1,31 <sup>bc</sup>  | 7,82±1,17 <sup>abc</sup>  | 13,66±1,25 <sup>*/ab</sup> | 15,31±1,40 <sup>*/a</sup>  | 11,65±1,78 <sup>ab</sup>  | 3,19±1,78 <sup>c</sup>     | 10,42±2,61 <sup>abc</sup>   |
| <b>COLON</b>                   |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| Calcio                         |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 7,44±0,51   | 5,96±1,26   | 9,63±0,08 <sup>*/a</sup> | 3,03±0,65 <sup>*/bc</sup> | 9,34±0,93 <sup>*/a</sup>   | 0,98±0,09 <sup>*/c</sup>   | 3,14±0,31 <sup>bc</sup>   | 3,75±0,46 <sup>c</sup>     | 5,31±0,82 <sup>b</sup>      |
| En la fase líquida             | 1,33±0,12   | 1,16±0,06   | 1,17±0,03 <sup>a</sup>   | 1,28±0,08 <sup>a</sup>    | 2,90±0,41 <sup>a</sup>     | 2,13±0,94 <sup>a</sup>     | 2,09±1,10 <sup>a</sup>    | 1,37±0,71 <sup>a</sup>     | 1,46±0,13 <sup>a</sup>      |
| % en fase líquida              | 15,34±2,08  | 17,79±4,43  | 10,86±0,19 <sup>b</sup>  | 30,86±4,30 <sup>ab</sup>  | 23,56±0,93 <sup>b</sup>    | 61,66±12,21 <sup>*/a</sup> | 35,60±11,67 <sup>ab</sup> | 23,48±9,76 <sup>b</sup>    | 21,85±1,16 <sup>b</sup>     |
| Magnesio                       |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 1,71±0,29   | 0,25±0,04   | 0,34±0,01 <sup>a</sup>   | 0,15±0,01 <sup>b</sup>    | 0,27±0,03 <sup>a</sup>     | 0,10±0,00 <sup>*/bc</sup>  | 0,08±0,04 <sup>*/c</sup>  | 0,13±0,05 <sup>*/b</sup>   | 0,26±0,09 <sup>a</sup>      |
| En la fase líquida             | 1,03±0,02   | 0,48±0,08   | 0,20±0,03 <sup>a</sup>   | 0,46±0,06 <sup>a</sup>    | 0,45±0,09 <sup>a</sup>     | 0,50±0,33 <sup>a</sup>     | 0,41±0,02 <sup>a</sup>    | 0,59±0,37 <sup>a</sup>     | 0,44±0,12 <sup>a</sup>      |
| % en fase líquida              | 38,40±3,78  | 65,82±0,83  | 37,22±3,63 <sup>b</sup>  | 75,23±2,12 <sup>ab</sup>  | 61,08±4,54 <sup>ab</sup>   | 69,46±13,68 <sup>ab</sup>  | 84,63±6,72 <sup>a</sup>   | 68,11±14,45 <sup>ab</sup>  | 60,58±6,40 <sup>ab</sup>    |
| Fósforo                        |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 4,84±0,90   | 2,26±0,68   | 3,17±0,75 <sup>a</sup>   | 1,32±0,27 <sup>bc</sup>   | 2,48±0,25 <sup>ab</sup>    | 0,51±0,27 <sup>*/c</sup>   | 1,10±0,01 <sup>bc</sup>   | 1,07±0,03 <sup>bc</sup>    | 1,93±0,01 <sup>abc</sup>    |
| En la fase líquida             | 0,03±0,00   | 0,10±0,02   | 0,03±0,00 <sup>a</sup>   | 0,10±0,03 <sup>a</sup>    | 0,08±0,01 <sup>a</sup>     | 0,06±0,03 <sup>a</sup>     | 0,09±0,02 <sup>a</sup>    | 0,03±0,00 <sup>a</sup>     | 0,11±0,01 <sup>a</sup>      |
| % en fase líquida              | 0,64±0,15   | 4,81±1,42   | 1,14±0,21 <sup>b</sup>   | 6,58±1,26 <sup>ab</sup>   | 2,99±0,19 <sup>ab</sup>    | 9,18±2,59 <sup>a</sup>     | 7,66±2,17 <sup>ab</sup>   | 3,07±0,74 <sup>ab</sup>    | 5,56±0,17 <sup>ab</sup>     |
| Hierro                         |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| En la fase sólida              | 0,76±0,17   | 0,38±0,12   | 0,34±0,08 <sup>ab</sup>  | 0,28±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,48±0,05 <sup>a</sup>     | 0,14±0,08 <sup>b</sup>     | 0,11±0,01 <sup>b</sup>    | 0,14±0,02 <sup>b</sup>     | 0,32±0,05 <sup>ab</sup>     |
| En la fase líquida             | 0,033±0,024 | 0,031±0,017 | 0,016±0,012 <sup>a</sup> | 0,046±0,007 <sup>a</sup>  | 0,021±0,000 <sup>a</sup>   | 0,039±0,015 <sup>a</sup>   | 0,025±0,001 <sup>a</sup>  | 0,041±0,031 <sup>a</sup>   | 0,044±0,012 <sup>a</sup>    |
| % en fase líquida              | 3,41±1,87   | 6,60±1,61   | 5,38±4,46 <sup>a</sup>   | 15,52±4,76 <sup>a</sup>   | 4,34±0,45 <sup>a</sup>     | 25,25±8,17 <sup>a</sup>    | 19,05±1,12 <sup>a</sup>   | 18,62±11,78 <sup>a</sup>   | 13,11±4,91 <sup>a</sup>     |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma fila indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-c</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

<sup>o</sup> (contenido mineral en la fase líquida) / [(contenido mineral en la fase líquida) + (contenido mineral en la fase sólida)] x 100

#### 4.5.3. Morfología de la mucosa del ciego y del colon

En la **Tabla 49** se muestra la altura de las criptas y la densidad celular por cripta del epitelio de la pared del ciego y colon (en ambas porciones: proximal y distal). En el ciego no se apreciaron diferencias en la altura de las criptas y en la densidad celular cuando se comparan los grupos alimentados con diferentes dietas. Respecto al colon, en la porción proximal todos los grupos problema mostraron una altura en sus criptas significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor (de 342,22  $\mu\text{m}$  con la dieta probiótica a 448  $\mu\text{m}$  con la dieta simbiótica al 1,2%) a las del grupo control (300,23  $\mu\text{m}$ ). En cuanto a la densidad celular por cripta, los grupos alimentados con las dietas probiótica, prebióticas al 1,2 y 10%, y simbiótica al 5% (de 30,0 células con la dieta prebiótica al 1,2% a 32,89 células con la dieta probiótica) fueron los que mostraron un mayor número de células por cripta, siendo su número significativamente mayor al encontrado en el grupo control (26,50 células). En el colon distal todos los grupos problema mostraron unas criptas significativamente ( $p < 0,05$ ) más altas (de 347,39 con la dieta simbiótica al 1,2% a 395,12  $\mu\text{m}$  con la dieta simbiótica al 10%) que el grupo control (316,84  $\mu\text{m}$ ). En cuanto a la densidad celular por cripta, fueron los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 1,2 y 5% y simbióticas al 5 y 10% los que mostraron un número significativamente ( $p < 0,05$ ) más alto de células (de 28,43 células con la dieta prebiótica al 5% a 32,33 células con la dieta simbiótica al 10%) que el grupo alimentado con la dieta control (25,57 células).

Estos datos ponen de manifiesto que la adición de bifidobacterias y/o 4'-GOS a las dietas no tuvo ningún efecto morfológico sobre el epitelio del ciego, al menos en la porción correspondiente al ápice del mismo, pero sí sobre la altura de las criptas y densidad celular, tanto del colon proximal como distal. Respecto a este último parámetro, y a diferencia de la altura de las criptas en las que el incremento se observó en todos los grupos, el efecto de la dieta se detectó en el colon proximal en los grupos alimentados con las dietas probiótica, prebióticas al 1,2 y 10% y simbiótica al 5%, y en el colon distal con las dietas prebióticas al 1,2 y 5% y simbióticas al 5 y 10%.

Los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 5% y simbióticas al 1,2 y 10% mostraron en el colon proximal una altura de las criptas significativamente ( $p < 0,05$ ) superior a la del grupo control pero con una densidad celular sin diferencias significativas. Este mismo efecto también ocurrió en la porción del colon distal en los grupos alimentados con las dietas probiótica, prebiótica al 10% y simbiótica al 1,2%. Este hecho implica un aumento de tamaño de las células de las criptas epiteliales en los grupos descritos, que ha sido explicado en líneas celulares de colon de rata debido a que los AGCC producidos en el lumen intestinal son absorbidos por los colonocitos disminuyendo el pH intracelular. Con el fin de recuperara el pH, en las células son activados los mecanismos de intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{H}^+/\text{AGCC}$  provocando un aumento del volumen celular (Diener y col., 1993).

En el hombre se ha descrito que la fermentación de los hidratos de carbono que escapan a la hidrólisis enzimática del intestino delgado sucede principalmente en el colon ascendente debido a la mayor disponibilidad de sustrato, lo que se traduce en un mayor crecimiento bacteriano y pH más ácido (Cummings y Macfarlane, 1991). En nuestro estudio el hecho de que la mucosa del colon haya experimentado cambios en la porción proximal y distal indica que las dietas han aportado una cantidad suficientemente alta de 4'-GOS para que sea fermentado en ambas porciones.

Los datos encontrados en la bibliografía son diferentes en cuanto a los efectos de los OND sobre la morfología del epitelio del intestino grueso en función del OND estudiado. Howard y col. (1995a) en ratas jóvenes que tomaron un 3% de FOS cc, XOS o goma arábica, observaron que únicamente el grupo alimentado con goma arábica mostró una altura de las criptas del ciego y del colon significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor a las del grupo control, y ninguno de los tratamientos estimuló la densidad celular del ciego y del colon. Tashiro y col. (1997) en ratas alimentadas con un 5% de FOS cc, nistosa, inulina, goma guar o celulosa, sólo encontraron diferencias significativas en la densidad celular de las criptas del ciego (25 células/cripta en el control y 30 células/cripta en grupos con inulina y goma guar), pero no en la del colon proximal ni distal. Sin embargo, nuestros resultados coinciden con los descritos por Howard y col. (1995b) que alimentaron con FOS al 0,3% a cerdos neonatos y encontraron que se incrementó la altura de las criptas y la zona de proliferación en el colon proximal y distal, pero no en el ciego.

También se ha descrito que la concentración de Ca en la dieta puede tener efecto en la proliferación celular de la mucosa del intestino grueso. En este sentido, Rémésy y col. (1993) observaron que tras la administración de inulina al 15%, la altura de las criptas del ciego y la densidad celular fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores en el grupo con una dieta con 800 mg Ca/100 g (320  $\mu\text{m}$  y 63 células/cripta, respectivamente) que el alimentado con una dieta que contenía 300 mg Ca/100 g.

**Tabla 49.** Morfología de la mucosa del colon y del ciego de las ratas

| Dietas          | CIEGO                      |                          | COLON (proximal)            |                             | COLON (distal)              |                            |
|-----------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                 | Altura de las criptas (mm) | Densidad celular         | Altura de las criptas (mm)  | Densidad celular            | Altura de las criptas (mm)  | Densidad celular           |
| AO4             | 316,38±6,77                | 26,75±1,03               | 400,68±3,18                 | 32,80±1,02                  | 338,58±10,17                | 34,28±0,68                 |
| Control         | 404,30±1,48                | 25,20±0,86               | 300,23±14,38                | 26,50±0,29                  | 316,84±5,62                 | 25,57±0,81                 |
| Probiótica      | 408,18±5,01 <sup>b</sup>   | 28,14±0,74 <sup>a</sup>  | 342,22±11,33 <sup>d/*</sup> | 32,89±0,65 <sup>a/*</sup>   | 376,23±7,04 <sup>a/*</sup>  | 25,33±0,41 <sup>d</sup>    |
| Prebiótica 1,2% | 448,52±5,01 <sup>a</sup>   | 27,80±0,92 <sup>a</sup>  | 386,76±6,61 <sup>c/*</sup>  | 30,00±0,84 <sup>ab/*</sup>  | 393,33±8,03 <sup>a/*</sup>  | 29,14±0,46 <sup>b/*</sup>  |
| Prebiótica 5%   | 366,92±6,91 <sup>c</sup>   | 27,50±0,29 <sup>a</sup>  | 406,64±5,58 <sup>bc/*</sup> | 29,43±0,37 <sup>b</sup>     | 375,25±11,43 <sup>a/*</sup> | 28,43±0,37 <sup>bc/*</sup> |
| Prebiótica 10%  | 358,74±15,08 <sup>bc</sup> | 27,14±0,55 <sup>a</sup>  | 417,16±4,84 <sup>ab/*</sup> | 30,17±1,75 <sup>abc/*</sup> | 397,90±11,41 <sup>a/*</sup> | 25,60±0,68 <sup>cd</sup>   |
| Simbiótica 1,2% | 397,21±0,83 <sup>b</sup>   | 25,25±1,84 <sup>ab</sup> | 448,72±7,74 <sup>a/*</sup>  | 25,67±0,56 <sup>c</sup>     | 347,39±7,94 <sup>a/*</sup>  | 27,29±0,56 <sup>bcd</sup>  |
| Simbiótica 5%   | 382,87±11,68 <sup>bc</sup> | 23,14±0,70 <sup>b</sup>  | 388,90±8,44 <sup>bc/*</sup> | 31,37±0,36 <sup>ab/*</sup>  | 395,12±7,78 <sup>a/*</sup>  | 31,33±1,12 <sup>ab/*</sup> |
| Simbiótica 10%  | 380,28±5,75 <sup>bc</sup>  | 25,67±0,33 <sup>ab</sup> | 383,08±7,21 <sup>cd/*</sup> | 30,10±0,38 <sup>b</sup>     | 372,94±8,20 <sup>a/*</sup>  | 32,33±0,33 <sup>a/*</sup>  |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna indica diferencias significativas ( $p<0,05$ ) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-d</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

#### 4.6. Efecto sobre la mineralización del fémur y tibia de las ratas

La estructura del mineral óseo está constituida principalmente por hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ) (Rasmussen y Bordier, 1974), sin embargo el hueso no sólo está compuesto por Ca y P, sino que el Mg también es necesario para su formación (Rude, 1996). Por este motivo se analizaron los huesos corporales largos más importantes del organismo de los mamíferos durante su crecimiento, para evaluar si un incremento en la absorción mineral se traduce en un mayor depósito de estos minerales en el hueso. El Fe por el contrario no tiene como órgano diana al sistema esquelético, si no que se encuentra mayoritariamente formando parte de la Hb, Mb y diversas enzimas. Sin embargo, hasta el 30% del Fe corporal está almacenado como ferritina y hemosiderina, el 30% está en el hígado, el 30% se presenta en la médula ósea, y el resto se encuentra en el bazo y los músculos (NCR, 1991; Czajka, 1996). Además, la evaluación del Fe contenido en la hemosiderina está considerado normalmente como la referencia estándar por ser el indicador más sensible y específico para la valoración de las reservas de Fe (Holyoake y col., 1993). Por tanto, también se midió el contenido de Fe que el fémur y la tibia presentaban almacenado en su médula ósea.

En la **Tabla 50** se muestra el peso seco, contenido en cenizas y en minerales (Ca, Mg, P y Fe), expresado en mg de mineral/g de hueso en peso seco, del fémur de las ratas empleadas en el estudio de balance mineral. Todos los grupos problema presentaron un fémur significativamente ( $p < 0,05$ ) menos pesado (de 282,25 mg con la dieta simbiótica al 1,2% a 304,13 mg con la dieta prebiótica al 5%) que el del grupo control (349,60 mg), siendo el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% el que mostró el hueso más ligero. En cuanto al contenido en cenizas, los grupos alimentados con las dietas prebióticas no mostraron diferencias con el grupo control (57,24%), siendo por el contrario menor el peso de los grupos alimentados con las dietas simbióticas y la probiótica. Sin embargo, y a pesar de estos valores de cenizas el contenido en Ca del fémur de todos los grupos problema fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior (de 181,07 mg con la dieta prebiótica a 206,78 mg con la dieta simbiótica al 5%) respecto al grupo control (156,03 mg), mostrando los grupos alimentados con las dietas prebiótica al 1,2% y simbióticas al 1,2 y 5% los mayores porcentajes (197,67, 196,74 y 206,78 mg, respectivamente) entre los grupos problema. El contenido en Mg del fémur de los grupos problema no fue superior al del grupo control (1,82 mg) en ningún caso y además en los grupos alimentados con las dietas prebióticas fue significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior (1,63, 1,62 y 1,6 mg, respectivamente). Sin embargo, el contenido en P se mostró significativamente ( $p < 0,05$ ) superior en los grupos alimentados con las dietas prebióticas y las dietas simbióticas al 1,2 y 10% (de 106,05 con la dieta prebiótica al 5% a 108,74 mg con la dieta prebiótica al 1,2%) respecto al del grupo control (103,56 mg). El contenido en Fe únicamente fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al grupo control (5,71 mg) en el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 5% (7,70 mg).

Podemos concluir que ninguno de los grupos problema mostró un fémur más pesado que el del grupo control, debido probablemente a que su desarrollo estuvo más relacionado con el peso del animal. Sin embargo, la deposición de Ca fue significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor en todos los grupos problema y la de P en los alimentados con las dietas prebióticas y las dietas simbióticas al 1,2 y 10%, mientras que con el Mg y Fe no se observó ningún efecto positivo. Respecto a la relación dosis-efecto, en ningún mineral se observó un efecto de mayor depósito en el fémur debido a un aumento de la concentración de prebióticos en la dieta. Tampoco se observó un efecto sinérgico cuando las bifidobacterias y el 4'-GOS se administraron de forma conjunta (dietas simbióticas).

**Tabla 50.** Mineralización del fémur (mg mineral/ g de hueso en peso seco) en ratas

| Dietas          | Peso seco (mg)              | Cenizas (%)                | Contenido Ca               | Contenido Mg             | Contenido P                  | Contenido Fe             |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| AO4             | 453,20±5,59                 | 56,77±0,44                 | 229,59±3,59                | 3,37±0,12                | 105,85±0,57                  | 7,23±0,89                |
| Control         | 349,60±10,76                | 57,24±0,10                 | 156,03±0,42                | 1,82±0,05                | 103,56±0,00                  | 5,71±0,80                |
| Probiótica      | 275,31±4,40 <sup>*/b</sup>  | 54,63±0,70 <sup>*/ab</sup> | 181,58±0,83 <sup>*/b</sup> | 1,72±0,08 <sup>a</sup>   | 105,31±0,38 <sup>bc</sup>    | 5,06±0,35 <sup>b</sup>   |
| Prebiótica 1,2% | 282,25±4,49 <sup>*/b</sup>  | 57,01±0,78 <sup>a</sup>    | 197,67±3,46 <sup>*/a</sup> | 1,63±0,00 <sup>*/a</sup> | 108,74±0,00 <sup>*/a</sup>   | 5,79±0,13 <sup>b</sup>   |
| Prebiótica 5%   | 304,13±2,75 <sup>*/a</sup>  | 55,81±0,41 <sup>ab</sup>   | 182,33±1,18 <sup>*/b</sup> | 1,62±0,08 <sup>*/a</sup> | 106,05±0,85 <sup>*/abc</sup> | 5,72±0,44 <sup>b</sup>   |
| Prebiótica 10%  | 289,00±8,74 <sup>*/ab</sup> | 55,56±0,45 <sup>ab</sup>   | 168,83±3,02 <sup>*/c</sup> | 1,60±0,02 <sup>*/a</sup> | 108,17±0,69 <sup>*/ab</sup>  | 5,77±0,38 <sup>b</sup>   |
| Simbiótica 1,2% | 197,52±7,09 <sup>*/c</sup>  | 53,89±0,64 <sup>*/b</sup>  | 196,74±3,71 <sup>*/a</sup> | 1,73±0,02 <sup>a</sup>   | 107,27±0,41 <sup>*/ab</sup>  | 6,25±0,06 <sup>ab</sup>  |
| Simbiótica 5%   | 267,43±2,74 <sup>*/b</sup>  | 54,51±0,76 <sup>*/ab</sup> | 206,78±0,41 <sup>*/a</sup> | 1,71±0,02 <sup>a</sup>   | 104,20±0,88 <sup>c</sup>     | 7,70±0,52 <sup>*/a</sup> |
| Simbiótica 10%  | 287,10±4,54 <sup>*/ab</sup> | 53,37±0,08 <sup>*/b</sup>  | 181,07±2,75 <sup>*/b</sup> | 1,63±0,01 <sup>*/a</sup> | 108,49±0,42 <sup>*/a</sup>   | 6,30±0,21 <sup>ab</sup>  |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-c</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

En la **Tabla 51** se muestra el peso, contenido en cenizas y en minerales (Ca, Mg, P y Fe), expresado en mg de mineral/g de hueso en peso seco, de la tibia de las ratas empleadas en el estudio de balance mineral. Todos los grupos problema presentaron una tibia significativamente ( $p < 0,05$ ) menos pesada (de 171,53 mg con la dieta simbiótica al 1,2% a 241,03 mg con la dieta prebiótica al 1,2%) que la del grupo control (285,72 mg) al igual que ocurriera con el fémur, siendo el grupo alimentado con la dieta simbiótica al 1,2% el que mostró el hueso más ligero. Como sucedió con el fémur, ningún grupo mostró un porcentaje de contenido en cenizas significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que el del grupo control (58,68%). El contenido en Ca de todos los grupos problema fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior al del grupo control (144,70 mg) oscilando los valores en los grupos problema desde 171,93 a 188,21 mg, no existiendo efecto debido a la concentración de 4'-GOS ni a la acción combinada de bifidobacterias y 4'-GOS. El contenido en Mg de la tibia en todos los grupos problema no mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el grupo control (2,44 mg). Sin embargo, el contenido en P fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior en los grupos alimentados con las dietas prebióticas y simbióticas respecto al grupo control (98,60 mg), no existiendo estas diferencias en el grupo probiótico y en el control. El contenido en Fe fue superior significativamente ( $p < 0,05$ ) al del

grupo control (7,06 mg) en el grupo alimentado con las dietas prebiótica al 5% y simbióticas al 1,2 y 10% (9,67, 9,50 y 9,81 mg, respectivamente).

Podemos concluir que al igual que con el fémur, ninguno de los grupos problema mostró una tibia más grande que la del grupo control, debido probablemente a que éste grupo tuvo un peso corporal significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que los grupos problema. Aunque tampoco se observó ningún efecto positivo sobre el contenido de Mg en la tibia, la incorporación de 4'-GOS tuvo un efecto claro de mayor deposición de Ca y P en la tibia de los grupos enriquecidos con este ingrediente, no existiendo relación entre la concentración de 4'-GOS empleada en las dietas y el depósito de estos minerales en el hueso.

**Tabla 51.** Mineralización de la tibia (mg mineral/ g de hueso en peso seco) en ratas

| Dietas          | Peso seco (mg)             | Cenizas (%)               | Contenido Ca                | Contenido Mg           | Contenido P                | Contenido Fe              |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| AO4             | 382,17±10,87               | 57,43±0,10                | 223,60±5,47                 | 2,99±0,22              | 108,33±1,95                | 7,68±0,22                 |
| Control         | 285,72±5,81                | 58,68±0,10                | 144,70±4,74                 | 2,44±0,15              | 98,60±3,55                 | 7,06±0,99                 |
| Probiótica      | 210,08±7,42 <sup>*/a</sup> | 57,02±0,22 <sup>a</sup>   | 171,93±2,12 <sup>*/b</sup>  | 2,58±0,08 <sup>a</sup> | 104,60±0,83 <sup>a</sup>   | 6,66±0,35 <sup>c</sup>    |
| Prebiótica 1,2% | 241,03±5,92 <sup>*/a</sup> | 57,12±0,04 <sup>a</sup>   | 187,58±2,09 <sup>*/a</sup>  | 2,76±0,07 <sup>a</sup> | 107,69±0,47 <sup>*/a</sup> | 7,64±0,71 <sup>bc</sup>   |
| Prebiótica 5%   | 238,78±5,45 <sup>*/a</sup> | 57,84±0,17 <sup>a</sup>   | 180,64±3,90 <sup>*/ab</sup> | 2,62±0,13 <sup>a</sup> | 105,92±0,92 <sup>*/a</sup> | 9,67±0,19 <sup>*/ab</sup> |
| Prebiótica 10%  | 231,15±6,15 <sup>*/a</sup> | 56,44±0,58 <sup>a</sup>   | 188,21±1,73 <sup>*/a</sup>  | 2,44±0,08 <sup>a</sup> | 106,96±0,86 <sup>*/a</sup> | 8,60±0,45 <sup>abc</sup>  |
| Simbiótica 1,2% | 171,53±3,23 <sup>*/b</sup> | 54,87±1,05 <sup>*/a</sup> | 180,34±0,81 <sup>*/ab</sup> | 2,71±0,04 <sup>a</sup> | 106,18±0,83 <sup>*/a</sup> | 9,50±0,10 <sup>*/ab</sup> |
| Simbiótica 5%   | 221,83±1,42 <sup>*/a</sup> | 54,65±1,18 <sup>*/a</sup> | 185,23±2,42 <sup>*/a</sup>  | 2,65±0,18 <sup>a</sup> | 107,33±1,00 <sup>*/a</sup> | 9,22±0,49 <sup>ab</sup>   |
| Simbiótica 10%  | 234,43±3,13 <sup>*/a</sup> | 55,49±1,89 <sup>a</sup>   | 179,92±0,28 <sup>*/ab</sup> | 2,75±0,24 <sup>a</sup> | 105,76±0,69 <sup>*/a</sup> | 9,81±0,39 <sup>*/a</sup>  |

Cada valor es la media±error típico, n=6

\* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica respecto al grupo control, realizada mediante un test de separación de medias bilateral

<sup>a-c</sup> Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos con dietas probiótica, prebiótica y simbiótica

Chonan y col. (1995) observaron que en ratas alimentadas con una dieta con 4'-GOS al 5% el contenido de Ca en el fémur aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ), pero que ni el peso seco ni en cenizas del fémur se modificaron respecto al grupo control, y por el contrario en la tibia aumentó significativamente el contenido en cenizas pero no se modificaron ni el peso seco ni el contenido en Ca de la tibia. En nuestro estudio tampoco se ha encontrado un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el peso seco ni en cenizas del fémur y la tibia, pero en ambos huesos el contenido en Ca fue significativamente ( $p < 0,05$ ) superior en todos los grupos problema. Junto al contenido de OND de la dieta, estos efectos son dependientes del contenido en Ca de las dietas administradas a los animales de experimentación. Así, mientras un contenido de Ca de 2.150 mg Ca/100 g en la dieta incrementa significativamente el peso en cenizas del fémur y el contenido en Ca del fémur y la tibia, un contenido de Ca sensiblemente más bajo (215 mg Ca/100 g) no afecta a los parámetros de mineralización ósea (Chonan y Watanuki, 1996). Las dietas empleadas en el presente trabajo contienen una cantidad intermedia de Ca (572 mg de Ca/100 g) de las empleadas por Chonan y Watanuki, aunque en la misma cantidad para los grupos problema y control, por lo que la diferencia apreciada en el depósito de Ca en huesos no fue debida a este factor sino al hecho diferenciador entre las dietas: la adición de bifidobacterias y 4'-GOS.

#### 4.7. Relación entre las variables morfológicas y pH del contenido del intestino grueso, la biodisponibilidad mineral y la mineralización ósea

##### 4.7.1. Efecto del peso inicial de las ratas en los pesos de los órganos diana (ciego, colon, fémur y tibia)

Al igual que fue realizado el estudio del efecto de diferentes pesos iniciales en la variabilidad de los parámetros de eficiencia alimentaria debida a los diferentes tipos de dietas empleados, se ha realizado este segundo estudio para comprobar el efecto que tuvo la dieta sobre las siguientes variables: *peso de la pared del ciego*, *peso de la pared del colon*, *peso seco del fémur* y *peso seco de la tibia*, pero controlando el influjo que el *peso inicial* (covariable) tuvo sobre estas seis variables. De esta manera podemos eliminar del estudio el efecto que pudieran tener diferentes pesos iniciales en la valoración del efecto de las dietas sobre los pesos de los órganos diana objeto de este estudio (ciego, colon, fémur y tibia).

En la **Tabla 52** puede observarse como la dieta fue un factor de variación en los pesos de las variables estudiadas y que en tres de ellas (*peso de la pared del ciego*, *peso de la pared del colon* y *peso seco de la tibia*) el peso inicial de las ratas no fue determinante en la existencia de diferencias significativas debidas al tipo de alimentación. Sólo en el caso del peso del fémur no podemos afirmar que la obtención de diferentes pesos de este hueso entre los distintos grupos no sea debido a la diferencia de pesos de las ratas con las que se inició el estudio.

**Tabla 52.** Estudio del efecto del peso inicial de los animales en la variación de los pesos de los órganos diana

| Variable                   | Dieta | Covariable: Peso inicial |
|----------------------------|-------|--------------------------|
| Peso de la pared del ciego | ***   | NS                       |
| Peso de la pared del colon | ***   | NS                       |
| Peso seco del fémur        | ***   | **                       |
| Peso seco de la tibia      | ***   | NS                       |

Diferencias significativas para: \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; NS=no significación

##### 4.7.2. Estudio de correlación entre los diferentes parámetros morfológicos y pH del intestino grueso, la biodisponibilidad mineral y la mineralización ósea

En la **Tabla 53** se muestran los índices de correlación entre los valores de pH de los contenidos del ciego y colon, y los parámetros histológicos de sus mucosas. Así, el pH del contenido del ciego no se correlacionó con la altura de las criptas ni con la densidad celular de las criptas de la mucosa del ciego, mientras que el pH del contenido del colon lo hace negativamente con la altura de las criptas y densidad celular del colon proximal ( $r=-0,773$  y  $-0,489$ , respectivamente) y con la densidad celular de las criptas del colon distal ( $r=-0,644$ ). Por tanto, es en la mucosa del colon donde se observa un efecto de estimulación de la proliferación celular debido a un menor pH del contenido del colon generado por la fermentación a este nivel

del 4'-GOS administrado en la dieta. A diferencia de lo descrito anteriormente, otros autores han encontrado en el ciego una correlación negativa entre el pH y la altura de las criptas (Tashiro y col., 1997), estando el pH menos correlacionado con la proliferación celular en las partes más distales del intestino grueso (Edwards y col., 1992), debido a que las fuentes de OND empleadas por estos autores fueron fermentadas fundamentalmente en ciego. No obstante, en nuestro estudio la fermentación de los OND incorporados en la dieta, bien por la flora cecal o colónica o por la aportada en la propia dieta (dietas simbióticas), tuvo lugar tanto en el ciego como en el colon, como así lo indican los bajos valores de pH descritos en los contenidos del ciego y colon (Tablas 46 y 47) y la alta correlación encontrada entre las variables pH del contenido del ciego y colon ( $r=0,87$ ).

**Tabla 53.** Índices de correlación entre el pH del contenido del ciego y colon con los parámetros histológicos en la mucosa del ciego y colon

|          |                             | Altura criptas ciego          | Densidad celular ciego          | pH colon                    |                               |
|----------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| pH ciego | I. correlación <sup>o</sup> | NS                            | NS                              | 0,870                       |                               |
|          | Significación               |                               |                                 | 0,000                       |                               |
|          |                             | Altura criptas colon proximal | Densidad celular colon proximal | Altura criptas colon distal | Densidad celular colon distal |
| pH colon | I. correlación              | -0,773                        | NS                              | -0,489                      | -0,644                        |
|          | Significación               | 0,000                         |                                 | 0,015                       | 0,001                         |

NS=no significación para  $p<0,05$ , <sup>o</sup> I. correlación: índice de correlación

En la **Tabla 54** se muestran los índices de correlación entre la AA mineral y los parámetros medidos en el ciego y colon. La AA del Ca estuvo correlacionada negativamente con el pH del contenido del colon ( $r=-0,502$ ) y positivamente con la altura de las criptas y la densidad celular en el colon proximal ( $r=0,418$  y  $0,556$ , respectivamente) y colon distal ( $r=0,870$  y  $0,581$ , respectivamente). La AA del Mg se correlacionó negativamente con el pH del contenido del ciego ( $r=-0,785$ ) y colon ( $r=-0,728$ ), pero positivamente con la altura de las criptas del colon proximal y distal ( $r=0,639$  y  $r=0,590$ , respectivamente) y con la densidad celular del colon distal ( $r=0,658$ ). La AA de P se correlacionó positivamente con la densidad celular del ciego ( $r=0,601$ ), la altura de las criptas del colon distal ( $r=0,581$ ) y la densidad celular del colon proximal ( $r=0,423$ ). La AA del Fe se correlacionó negativamente con el pH del contenido del ciego y la altura de las criptas del ciego ( $r=-0,671$  y  $-0,554$ , respectivamente). La absorción de este mineral también se correlacionó negativamente con el pH del contenido del colon y positivamente con la altura de las criptas del colon proximal ( $r=-0,666$  y  $r=0,730$ , respectivamente).

**Tabla 54.** Coeficientes de correlación entre la absorción aparente mineral y los parámetros medidos en el intestino grueso

|  |                             | <b>Calcio</b> | <b>Magnesio</b> | <b>Fósforo</b> | <b>Hierro</b> |
|--|-----------------------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|
| <b>pH ciego</b>                        | I. correlación <sup>º</sup> |               | -0,785          |                | -0,671        |
|  | Significación               | NS            | 0,000           | NS             | 0,000         |
| <b>pH colon</b>                        | I. correlación              | -0,502        | -0,728          | NS             | -0,666        |
|  | Significación               | 0,012         | 0,000           |                | 0,000         |
| <b>Altura criptas ciego</b>            | I. correlación              | NS            | NS              | NS             | -0,554        |
|  | Significación               |               |                 |                | 0,005         |
| <b>Altura criptas colon proximal</b>   | I. correlación              | 0,418         | 0,639           | NS             | 0,730         |
|  | Significación               | 0,042         | 0,001           |                | 0,000         |
| <b>Altura criptas colon distal</b>     | I. correlación              | 0,870         | 0,590           | 0,581          | NS            |
|  | Significación               | 0,000         | 0,002           | 0,003          |               |
| <b>Densidad celular ciego</b>          | I. correlación              | NS            | NS              | 0,601          | NS            |
|  | Significación               |               |                 | 0,002          |               |
| <b>Densidad celular colon proximal</b> | I. correlación              | 0,556         | NS              | 0,423          | NS            |
|  | Significación               | 0,005         |                 | 0,040          |               |
| <b>Densidad celular colon distal</b>   | I. correlación              | 0,581         | 0,658           | -0,503         | NS            |
|  | Significación               | 0,003         | 0,000           | 0,012          |               |

NS=no significación para  $p < 0,05$ , <sup>º</sup> I. correlación: índice de correlación

En la **Tabla 55** se muestran los índices de correlación entre la retención mineral y los parámetros medidos en el ciego y colon. La retención del Ca se correlacionó negativamente con el pH del contenido del colon ( $r = -0,463$ ) y positivamente con la altura de las criptas y la densidad celular del colon distal ( $r = 0,868$  y  $0,562$ , respectivamente) y con la densidad celular del colon proximal ( $r = 0,576$ ). Sin embargo la retención del Mg y P únicamente se correlacionaron de forma positiva con la densidad celular del ciego ( $r = 0,564$  y  $0,605$ , respectivamente). La retención del Fe se correlacionó negativamente con el pH del contenido del ciego y con la altura de las criptas del ciego ( $r = -0,658$  y  $-0,537$ ), y también tuvo una correlación negativa con el pH del contenido del colon ( $r = -0,643$ ), pero positiva con la altura de las criptas del colon proximal ( $r = 0,714$ ).

**Tabla 55.** Coeficientes de correlación entre la retención mineral y los parámetros medidos en el intestino grueso

|  |                             | <b>Calcio</b> | <b>Magnesio</b> | <b>Fósforo</b> | <b>Hierro</b> |
|--|-----------------------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|
| <b>pH ciego</b>                        | I. correlación <sup>º</sup> |               |                 | NS             | -0,658        |
|  | Significación               | NS            | NS              |                | 0,000         |
| <b>pH colon</b>                        | I. correlación              | -0,463        | NS              | NS             | -0,643        |
|  | Significación               | 0,023         |                 |                | 0,001         |
| <b>Altura criptas ciego</b>            | I. correlación              | NS            | NS              | NS             | -0,537        |
|  | Significación               |               |                 |                | 0,007         |
| <b>Altura criptas colon proximal</b>   | I. correlación              | NS            | NS              | NS             | 0,714         |
|  | Significación               |               |                 |                | 0,000         |
| <b>Altura criptas colon distal</b>     | I. correlación              | 0,868         | NS              | NS             | NS            |
|  | Significación               | 0,000         |                 |                |               |
| <b>Densidad celular ciego</b>          | I. correlación              | NS            | 0,564           | 0,605          | NS            |
|  | Significación               |               | 0,020           | 0,002          |               |
| <b>Densidad celular colon proximal</b> | I. correlación              | 0,576         | NS              | NS             | NS            |
|  | Significación               | 0,003         |                 |                |               |
| <b>Densidad celular colon distal</b>   | I. correlación              | 0,562         | NS              | NS             | NS            |
|  | Significación               | 0,003         |                 |                |               |

NS=no significación para  $p < 0,05$ , <sup>º</sup> I. correlación: índice de correlación

La **Tabla 56** muestra los coeficientes de correlación entre el contenido mineral del fémur y los parámetros estudiados en el intestino grueso, la absorción y retención mineral. Los contenidos de Ca y Fe mostraron índices de correlación negativos con los valores de pH de los contenidos de ciego y colon, destacando de entre ellos el presentado entre el depósito de Fe y los bajos valores de pH del contenido del ciego ( $r=-0,806$ ). Del resto de coeficientes para ambos minerales destacaremos los mostrados con la densidad celular en el colon distal, siendo de 0,70 para el Fe y de 0,58 para el Ca. Finalmente reseñaremos que el contenido de Mg y P en el fémur mostró en algunos casos bajos coeficientes de correlación con las variables estudiadas en el intestino grueso, y en otros, éstos no fueron significativos, siendo el P el único de los cuatro minerales que presentó una correlación significativa con la retención mineral ( $r=0,521$ ).

**Tabla 56.** Estudio de correlación establecido entre el contenido mineral del fémur y los balances minerales y parámetros medidos en el intestino grueso

|  |                             | <b>Calcio</b> | <b>Magnesio</b> | <b>Fósforo</b> | <b>Hierro</b> |
|--|-----------------------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|
| <b>pH ciego</b>                        | I. correlación <sup>º</sup> | -0,556        | NS              | NS             | -0,806        |
|  | Significación               | 0,005         |                 |                | 0,000         |
| <b>pH colon</b>                        | I. correlación              | -0,694        | NS              | NS             | -0,627        |
|  | Significación               | 0,000         |                 |                | 0,001         |
| <b>Altura criptas ciego</b>            | I. correlación              | NS            | NS              | NS             | NS            |
|  | Significación               |               |                 |                |               |
| <b>Altura criptas colon proximal</b>   | I. correlación              | 0,547         | NS              | 0,602          | NS            |
|  | Significación               | 0,006         |                 | 0,002          |               |
| <b>Altura criptas colon distal</b>     | I. correlación              | 0,514         | NS              | 0,456          | NS            |
|  | Significación               | 0,010         |                 | 0,025          |               |
| <b>Densidad celular ciego</b>          | I. correlación              | NS            | NS              | 0,437          | NS            |
|  | Significación               |               |                 | 0,033          |               |
| <b>Densidad celular colon proximal</b> | I. correlación              | NS            | NS              | NS             | NS            |
|  | Significación               |               |                 |                |               |
| <b>Densidad celular colon distal</b>   | I. correlación              | 0,581         | NS              | NS             | 0,700         |
|  | Significación               | 0,003         |                 |                | 0,000         |
| <b>Absorción Aparente</b>              | I. correlación              | NS            | NS              | NS             | NS            |
|  | Significación               |               |                 |                |               |
| <b>Retención</b>                       | I. correlación              | NS            | NS              | 0,521          | NS            |
|  | Significación               |               |                 | 0,009          |               |

NS=no significación para  $p<0,05$ , <sup>º</sup> I. correlación: índice de correlación

La **Tabla 57** muestra los coeficientes de correlación entre el contenido mineral de la tibia y los parámetros estudiados en el intestino grueso, la absorción y retención mineral. A diferencia de lo descrito en el fémur, se observa que todos los minerales tuvieron una correlación negativa con el pH del contenido del ciego y colon (de  $r=-0,472$  del Ca con el pH del contenido del ciego a  $r=-0,874$  del Fe con el pH del contenido del ciego) siendo destacable, al igual que ocurrió en el fémur, la correlación entre el depósito de Fe y los bajos valores de pH en los contenidos de ciego y colon. El Ca mostró una correlación positiva con los parámetros morfológicos del colon proximal y distal, siendo ésta más elevada con altura de las criptas ( $r=0,806$  y  $0,876$ , respectivamente) y con la AA ( $r=0,795$ ) y retención de Ca ( $r=0,768$ ), y más moderada con la densidad celular ( $r=0,406$  y  $0,435$ , respectivamente). Para el contenido en Mg

de la tibia, la correlación fue positiva con la altura de las criptas del colon proximal ( $r=0,430$ ) y con la densidad celular del colon distal ( $r=0,733$ ). El P se correlacionó de forma positiva con la altura de las criptas y con la densidad celular del colon proximal ( $r=0,787$  y  $0,425$ , respectivamente) y distal ( $r=0,868$  y  $0,460$ , respectivamente). Finalmente, en el contenido en Fe existió una correlación positiva con la altura de las criptas del colon proximal ( $r=0,735$ ) y con la densidad celular del colon distal ( $r=0,643$ ). También se correlacionó positivamente con la AA ( $r=0,728$ ) y retención de Fe ( $r=0,714$ ).

De todos los parámetros correlacionados con el depósito mineral en fémur y tibia son la AA y retención mineral los que influyen de una manera directa en la fijación mineral por el hueso, ya que cuanto mayor sea la cantidad de mineral absorbida en intestino y retenida por el organismo, mayor puede ser su depósito en el hueso. En este sentido se debe destacar los coeficientes de correlación encontrados en la tibia para el Ca y Fe, que indican que altos valores en su AA y retención tienen un reflejo positivo en el depósito de Ca y Fe en la tibia, es decir que las dietas a la que se adicionó 4'-GOS aumentaron la cantidad de mineral (Ca y Fe) en huesos debido a sus altos valores de AA y retención, frente a las dietas control y con prebióticos cuyos valores de balance y depósito mineral fueron inferiores (Tabla 42, 45 y 51).

**Tabla 57.** Estudio de correlación establecido entre el contenido mineral de la tibia y los balances minerales y parámetros medidos en el intestino grueso

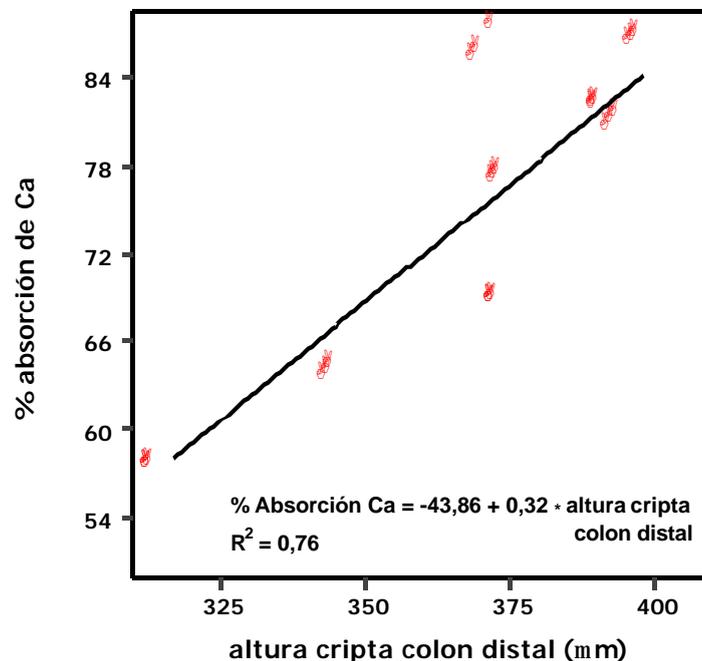
|  |                             | Calcio | Magnesio | Fósforo | Hierro |
|--|-----------------------------|--------|----------|---------|--------|
| <b>pH ciego</b>                        | I. correlación <sup>º</sup> | -0,472 | -0,537   | -0,476  | -0,874 |
|  | Significación               | 0,020  | 0,007    | 0,019   | 0,000  |
| <b>pH colon</b>                        | I. correlación              | -0,734 | -0,574   | -0,745  | -0,839 |
|  | Significación               | 0,000  | 0,003    | 0,000   | 0,001  |
| <b>Altura criptas ciego</b>            | I. correlación              | NS     | NS       | NS      | NS     |
|  | Significación               |        |          |         |        |
| <b>Altura criptas colon proximal</b>   | I. correlación              | 0,806  | 0,430    | 0,787   | 0,735  |
|  | Significación               | 0,000  | 0,036    | 0,000   | 0,000  |
| <b>Altura criptas colon distal</b>     | I. correlación              | 0,876  | NS       | 0,868   | NS     |
|  | Significación               | 0,000  |          | 0,000   |        |
| <b>Densidad celular ciego</b>          | I. correlación              | NS     | NS       | NS      | NS     |
|  | Significación               |        |          |         |        |
| <b>Densidad celular colon proximal</b> | I. correlación              | 0,406  | NS       | 0,425   | NS     |
|  | Significación               | 0,049  |          | 0,038   |        |
| <b>Densidad celular colon distal</b>   | I. correlación              | 0,435  | 0,733    | 0,460   | 0,643  |
|  | Significación               | 0,033  | 0,000    | 0,024   | 0,001  |
| <b>Absorción Aparente</b>              | I. correlación              | 0,795  | NS       | NS      | 0,728  |
|  | Significación               | 0,000  |          |         | 0,000  |
| <b>Retención</b>                       | I. correlación              | 0,768  | NS       | NS      | 0,714  |
|  | Significación               | 0,000  |          |         | 0,000  |

NS=no significación para  $p<0,05$ , <sup>º</sup> I. correlación: índice de correlación

#### 4.7.3. Estudio de regresión entre la absorción mineral, los parámetros morfológicos y el pH del contenido del intestino grueso

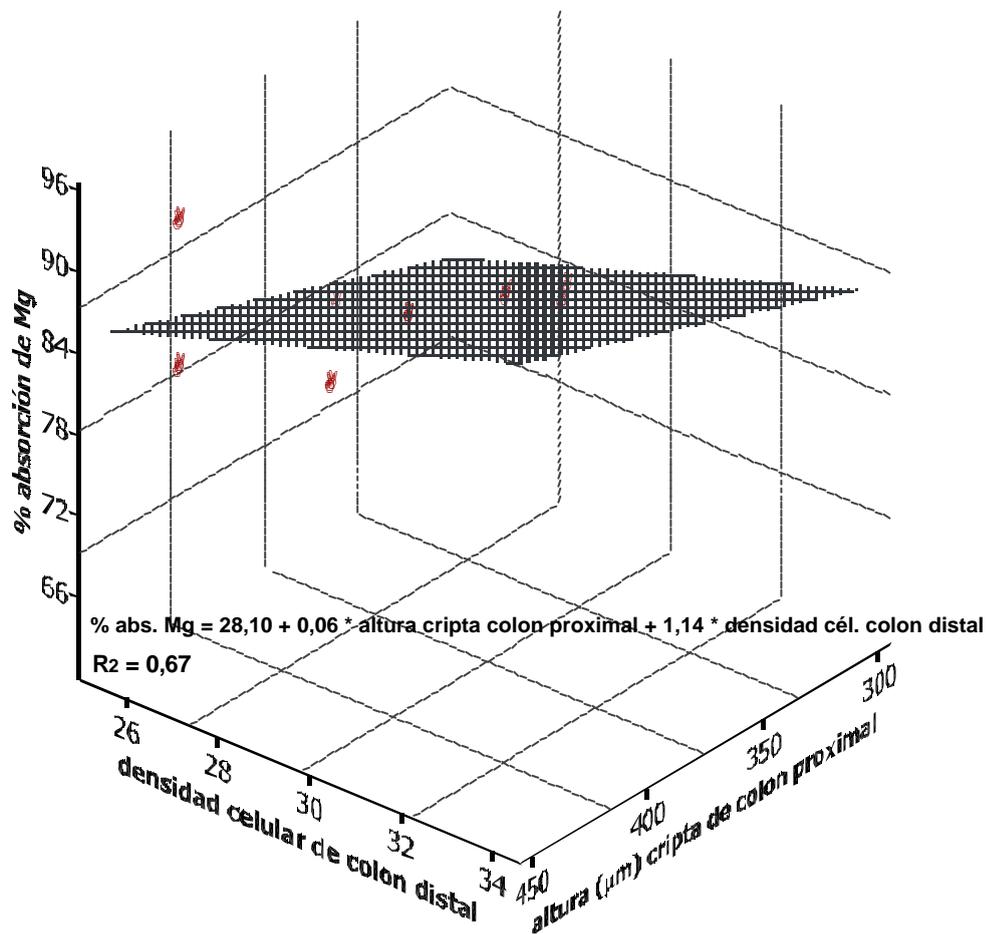
El estudio de correlación realizado para la absorción mineral y mostrado en la tabla 54 ha revelado la relación significativa entre este parámetro y la modificación del pH y morfología del intestino como consecuencia de las diferentes dietas administradas. Basándonos en estas evidencias de relación ha sido realizado el siguiente estudio de regresión lineal mediante la técnica de pasos sucesivos, con el fin de obtener ecuaciones de regresión lineal para la absorción de Ca, Mg y Fe con las que predecir sus porcentajes de absorción en intestino grueso a partir de las variables estudiadas (pH, altura de las criptas y densidad celular de las mismas en ciego y colon). Para el P no fue posible obtener un modelo de regresión lineal con el que predecir el comportamiento de su absorción intestinal.

En la **Figura 23** podemos observar la relación lineal existente entre la absorción de Ca y la altura de las criptas de colon distal (% Absorción Ca =  $-43,86 + 0,32 \times$  altura cripta colon distal,  $R^2=0,76$ ). Dicha relación es lineal creciente, por lo que en aquellos grupos en los que se describió criptas de mayor altura en la porción distal del colon se obtuvieron mayores porcentajes de absorción de Ca (grupos alimentados con las tres dietas prebióticas y las simbióticas al 5 y 10%).



**Figura 23.** Representación gráfica de la relación lineal entre la absorción de Ca y la altura de las criptas del colon distal

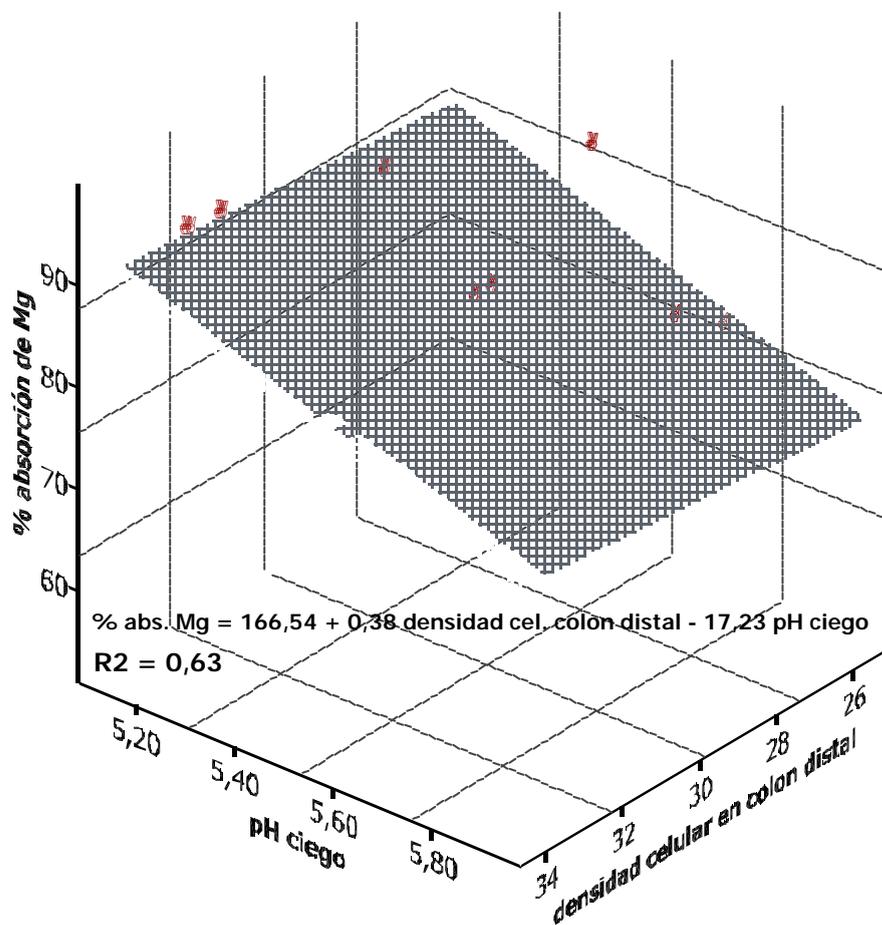
En el estudio de regresión realizado para predecir la absorción de Mg mediante la técnica de pasos sucesivos se obtuvieron cuatro modelos, que a diferencia del Ca no fueron modelos de regresión lineal simple sino múltiple. La **Figura 24** muestra un primer modelo cuya configuración espacial representa la correspondencia entre el aumento de las criptas en la porción proximal del colon y la densidad celular en las criptas del colon distal con los mayores porcentajes de absorción de Mg (% abs. Mg = 28,10 + 0,06 x altura cripta colon proximal + 1,14 x densidad cél. colon distal, R<sup>2</sup>=0,67).



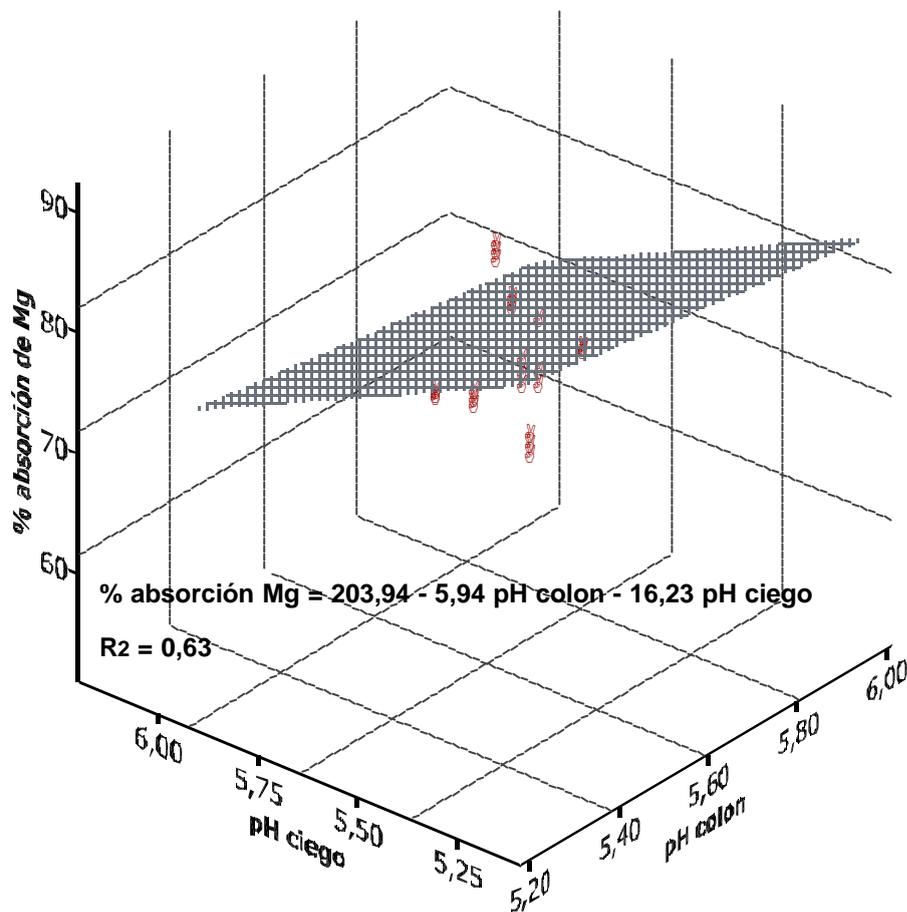
**Figura 24.** Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Mg, la densidad celular del colon distal y la altura de las criptas del colon proximal

En el segundo modelo predictivo (**Figura 25**) la absorción de este mineral se determina a partir de la densidad celular del colon distal y pH del contenido del ciego (% abs. Mg = 166,54 + 0,38 x densidad cél. colon distal – 17,23 x pH ciego, R<sup>2</sup>=0,63). El tercer modelo (**Figura 26**) tiene en cuenta el pH del contenido del ciego y del colon (% abs. Mg = 203,94 –

$5,94 \times \text{pH colon} - 16,23 \times \text{pH ciego}$ ,  $R^2=0,63$ ). Por último, el cuarto modelo representa la conjunción de las variables independientes de los modelos anteriores (pH del contenido del ciego, altura de las criptas de colon proximal y densidad celular del colon distal) en el que el porcentaje de absorción de Mg vendrá determinado por la suma de los efectos producidos por las tres variables citadas ( $\% \text{ abs. Mg} = 88,67 + 0,74 \times \text{densidad cél. colon distal} + 0,045 \times \text{altura cripta colon proximal} - 7,91 \times \text{pH ciego}$ ,  $R^2=0,70$ ).



**Figura 25.** Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Mg, la densidad celular del colon distal y el pH del contenido del ciego



**Figura 26.** Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Mg, el pH del contenido del ciego y del colon

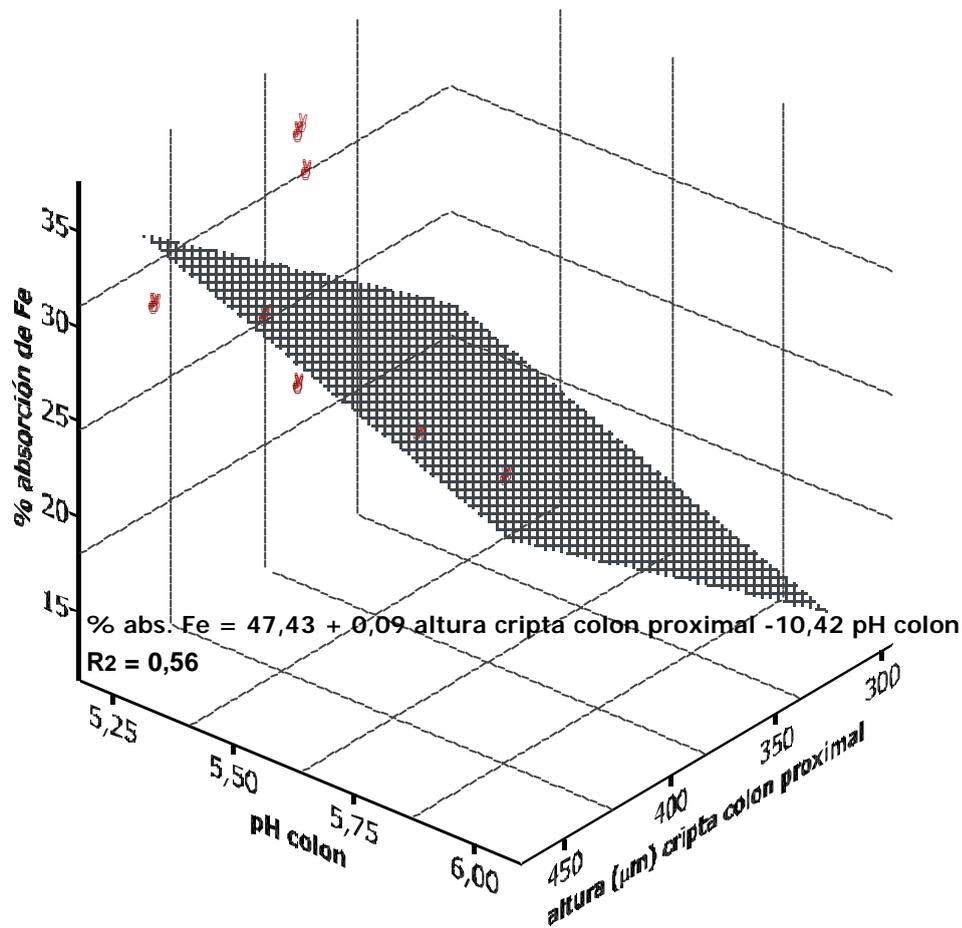
De los estudios de regresión realizados para la absorción de Ca y Mg se desprende que para el primero la absorción se realiza fundamentalmente en el colon, posiblemente debido al hecho de que los grupos con mayor altura de criptas y similar número de células en las mismas presenten células de mayor tamaño, y por lo tanto con mayor superficie de captación del catión. En este sentido Delzenne y col. (1995) han propuesto el incremento de la superficie de absorción en el intestino grueso como un mecanismo que explique una mayor retención de Ca y Mg. De igual manera se ha descrito en colonocitos aislados de rata (Diener y col., 1993) y humanos (Rowe y col., 1993) que la exposición de los mismos a los AGCC produce un descenso del pH intracelular. Para la recuperación del pH las células disponen de una serie de mecanismos entre los que podrían estar implicados el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y el cotransporte  $\text{H}^+/\text{AGCC}$ . Este intercambio de iones causa un incremento del volumen celular y del contenido de  $\text{Na}^+$  intracelular.

La absorción de Mg por el contrario no solo ocurre en el colon sino también en el ciego, como ha sido descrito por los modelos de regresión lineal. Bajos valores de pH en el contenido del ciego fomentan la aparición de formas solubles de este mineral facilitando su paso a través de la pared del ciego (Scharrer y Lutz, 1992; Baba y col., 1996). Sin embargo, el pH del contenido del colon tuvo un efecto pequeño o solapado a las variables morfológicas de este segmento del intestino, ya que su incorporación a la ecuación de regresión (cuarto modelo) no incrementó el coeficiente de correlación de la misma (0,70) a pesar de ser su efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ). Respecto al efecto de las criptas de colon, es de destacar que la absorción de Mg se incrementó a medida que fue mayor la densidad celular en el colon distal y la altura de las criptas del colon proximal.

Las ecuaciones de regresión para Ca y Mg indican que las variables que explican la absorción de uno u otro mineral son diferentes, fenómeno que puede ser debido a la competencia descrita entre el Ca y Mg por los lugares de absorción en el intestino grueso (Ohta y col., 1994a). Diferentes estudios han demostrado que el ciego y colon tienen capacidad para absorber Ca y Mg, sin embargo el segmento del intestino donde tiene lugar dicha absorción varía en función del mineral y de la fuente de fibra fermentable que promueva la absorción (Demigné y col., 1989; Levrat y col., 1991; Younes y col., 1993; Ohta y col., 1995a). Chonan y Takahashi (1999) han descrito que el efecto de los GOS en la absorción de Ca ocurre principalmente en ciego debido a un efecto trófico sobre la mucosa del mismo, mientras que para el Mg el incremento de absorción debida a una alimentación rica en GOS se debe a una contribución de diferentes partes del intestino (ciego, colon y recto). Sin embargo, Delzenne y col. (1995) utilizando FOS como fuente de hidratos de carbono no digeribles, encontraron que la absorción de Mg ocurre principalmente en el colon, y por el contrario la de Ca fue en ciego debido a un efecto estimulante de la mucosa cecal. En nuestro estudio como ha sido descrito no se ha encontrado ninguna relación positiva entre la absorción de Ca y las variables morfológicas de ciego. Por el contrario en el colon proximal y distal fueron descritas diferencias en la altura de las criptas y densidad celular entre los diferentes grupos, siendo por lo tanto una explicación posible del incremento de la absorción de Ca y Mg debidas al aumento de la superficie de absorción. A su vez el descenso del pH del contenido del ciego motivado por la fermentación microbiana de los GOS puede generar formas solubles de Mg en las que sea más fácil su absorción.

Finalmente, la **Figura 27** representa tridimensionalmente la tendencia mostrada por la variable porcentaje de absorción de Fe, que al igual que ha sido descrito para la absorción de Mg, el incremento en su absorción estuvo determinada por los bajos valores de pH en el contenido del ciego y los mayores de la altura de las criptas en el colon proximal. El efecto de los hidratos de carbono fermentables sobre la biodisponibilidad mineral del Fe está poco documentada. Kim y Atallah (1993) han propuesto un mecanismo de absorción a través de complejos solubles con grupos carboxílicos derivados de la fermentación cuando se utiliza la

pectina como fuente de hidratos de carbono fermentable. Estos complejos solubles Fe-grupos carboxílicos ven facilitado su paso a través de la membrana celular.



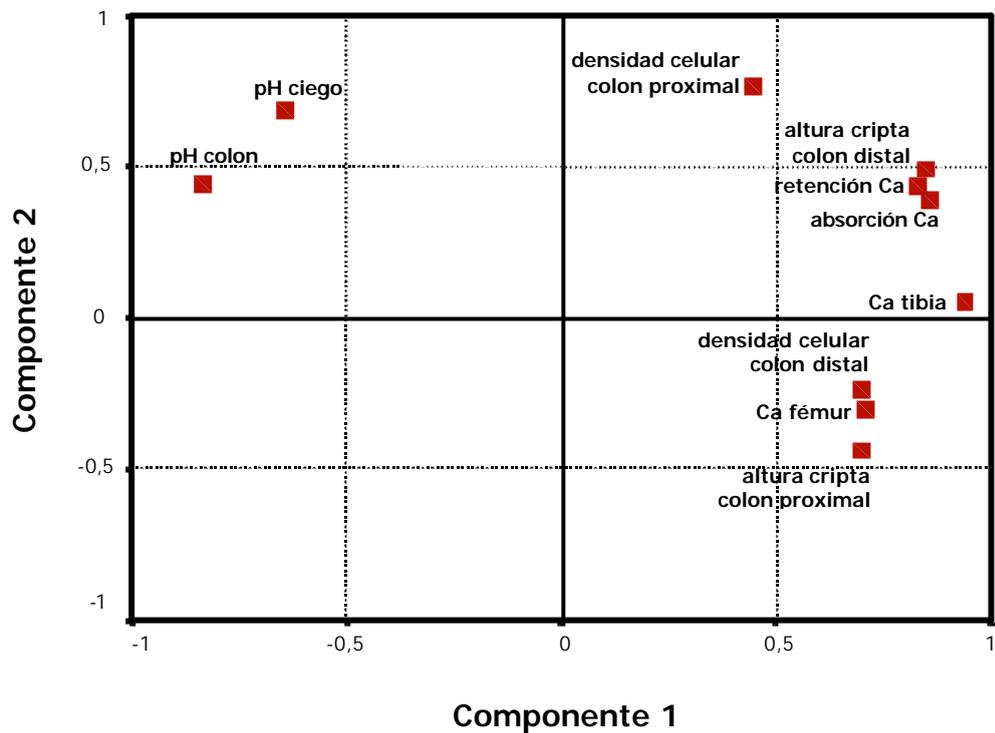
**Figura 27.** Representación gráfica tridimensional de la relación entre la absorción de Fe, el pH del contenido del colon y la altura de las criptas del colon proximal

#### 4.7.4. Análisis factorial

De los estudios de correlación descritos anteriormente y mostrados en las Tablas 54-57 hemos obtenido conclusiones parciales acerca de cómo están relacionadas dos a dos cada par de variables enfrentadas. Con el análisis factorial intentamos identificar aquellas variables subyacentes o factores que explican la configuración de las correlaciones dentro del conjunto de variables estudiadas, es decir una reducción de los datos de un gran número de variables

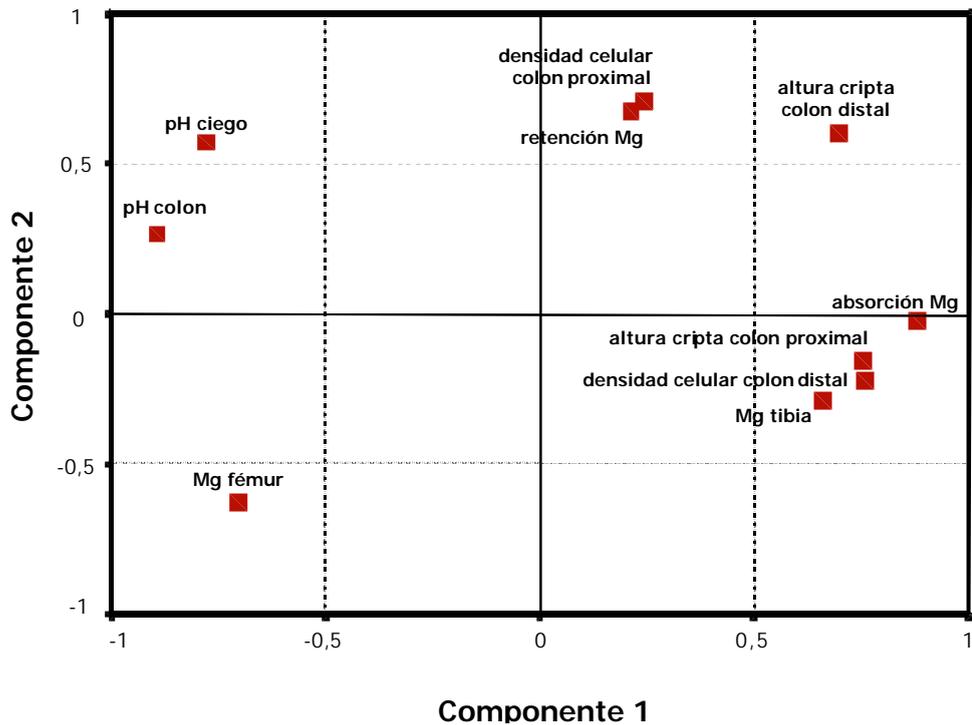
para identificar un pequeño número de factores (en nuestro estudio dos, Componente 1 y 2) que expliquen la mayoría de la varianza observada (expresada como varianza total explicada). Como método de extracción factorial fue empleado el análisis de componentes principales (ACP) con el que podremos obtener combinaciones lineales entre las variables y generar hipótesis relacionadas con los mecanismos causales. Este estudio fue realizado de forma separada para los cuatro minerales (Figuras 28-31) con el fin de identificar las relaciones de los contenidos minerales del fémur y la tibia con las variables morfológicas del intestino grueso, el pH del contenido del ciego y del colon. Del estudio se eliminaron aquellas variables que a priori no iban a influir en el análisis factorial debido a que no mostraron variación entre los grupos. De esta forma la altura de las criptas y la densidad celular en ciego fueron eliminadas del estudio.

La **Figura 28** representa el ACP realizado para el Ca, cuya varianza total explicada fue de 79,75%, lo que significa que este modelo representa casi el 80% de la variabilidad de los datos obtenidos para los parámetros analizados. El Componente 1 (eje horizontal) representa la relación inversa entre los valores del pH del contenido del ciego y del colon y el resto de variables analizadas. Como muestran las tablas de correlación parcial (Tablas 54, 56 y 57), esta relación inversa es mayor para el pH del contenido del colon y el contenido en Ca en tibia ( $r=-0,73$ ), pH del contenido del colon y contenido en Ca en fémur ( $r=-0,69$ ), y el pH del contenido del colon y la absorción intestinal de Ca ( $r=-0,5$ ). En el Componente 2 (eje vertical) se ha evaluado la asociación entre las variables por su proximidad en el plano. En primer lugar y como se representa en las cuatro figuras de componentes principales, el pH del contenido del ciego y colon aparecen próximos en el plano indicando que bajos valores en un segmento del intestino se corresponden igualmente con bajos valores en el otro ( $r=0,87$  en Tabla 53), o lo que es lo mismo que los GOS son fermentados igualmente en ciego y colon ocasionando un descenso paralelo del pH del contenido en ambos segmentos del intestino grueso. El Componente 2 representa también la relación lineal entre la absorción y retención de Ca con la altura de las criptas del colon distal (Figura 28) y entre la absorción intestinal de Ca y el depósito de Ca en la tibia. Finalmente este tipo de análisis permite descubrir la relación entre variables cuando no existe una relación lineal directa entre ellas, como por ejemplo entre el depósito mineral en fémur y tibia y los parámetros morfológicos del intestino grueso. De esta manera podemos establecer que aquellos grupos en los que se encontraron mayores niveles de Ca en fémur se correspondieron con los que mostraron una mayor densidad celular en el colon distal y altura de las criptas en el colon proximal. Por último también se puede establecer una relación entre el contenido de Ca en la tibia y la mayor altura de las criptas en el colon distal ( $r=0,88$ , Tabla 57).



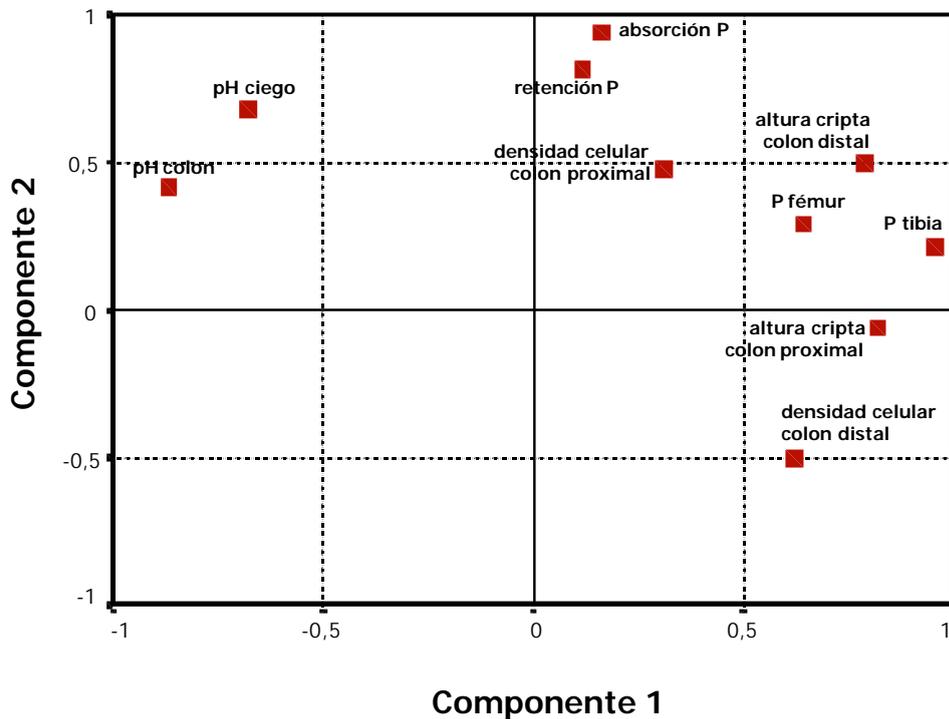
**Figura 28.** Análisis de componentes principales (ACP) para el calcio

El ACP realizado para representar la relación del contenido de Mg del fémur y la tibia con los parámetros del intestino grueso (**Figura 29**) mostró una varianza total explicada del 71,17%. Al igual que fue descrito para el modelo obtenido en el Ca, el Componente 1 (eje horizontal) representó la relación inversa entre el pH del contenido del ciego y del colon y la absorción de Mg. Por otra parte, del estudio de esta figura se desprenden los tres puntos siguientes: a) la existencia de una gran distancia relativa entre las variables absorción y retención de Mg, debida a una gran eliminación de Mg por orina, fundamentalmente en los grupos alimentados con las dietas simbiótica al 1,2 y 5% (Tabla 43); b) la relación del contenido de Mg en la tibia con la altura de las criptas del colon proximal (como fue descrito para el Ca) y la densidad celular en el colon distal; y c) la ausencia de relación del contenido de Mg en el fémur con todas las variables estudiadas, tal como muestra la Tabla 56 de correlaciones parciales. Finalmente, podemos observar gráficamente por la dispersión de las variables en el plano los cuatro modelos de regresión lineal establecido para este mineral.



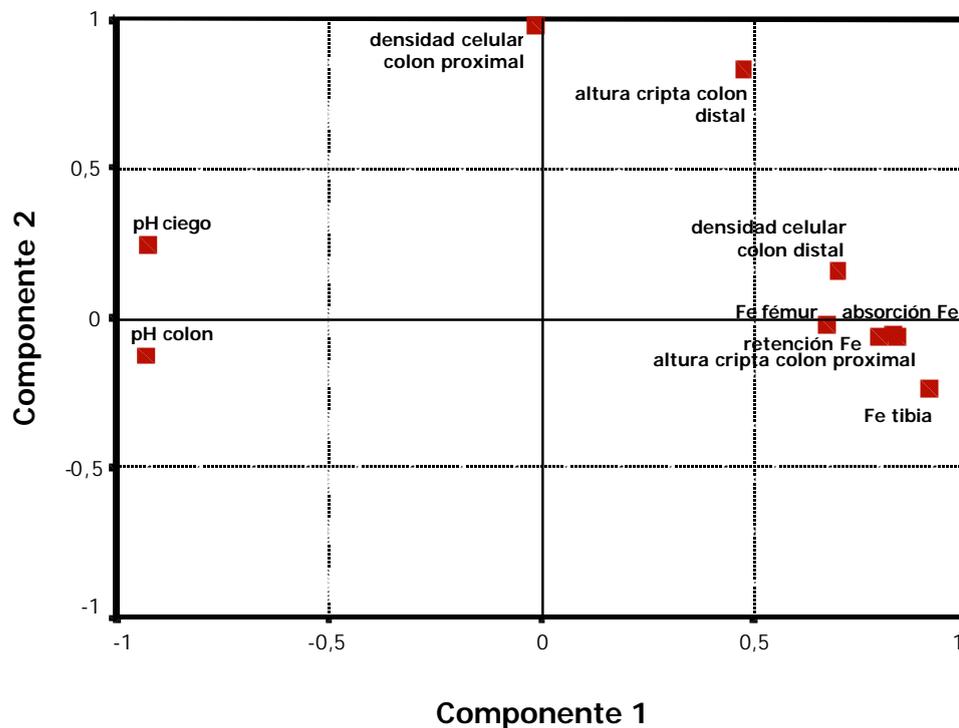
**Figura 29.** Análisis de componentes principales (ACP) para el magnesio

La **Figura 30** representa el ACP realizado para observar gráficamente la relación entre el balance de P y su fijación en la tibia y fémur con las variables medidas en el ciego y colon, mostrando una varianza total explicada del 74,01%. A diferencia de los dos estudios anteriores la distribución de las variables en el plano presentó mayor dispersión, por lo que la interpretación del gráfico por medio de distancias o disimilaridades no resulta tan sencilla. No obstante, se puede apreciar nuevamente la relación de proximidad entre ambos parámetros de pH, y entre la absorción y retención de P (indicando que la excreción renal de P fue poco importante). Como muestran las tablas de correlación (Tablas 56 y 57), el contenido de P en fémur y tibia presentó una relación positiva con valores elevados de altura de las criptas de colon proximal y distal, e inversamente proporcional a los bajos valores de pH, de forma más clara en el contenido del P en tibia. Estas relaciones pueden apreciándose en el gráfico por su disposición en el plano.



**Figura 30.** Análisis de componentes principales (ACP) para el fósforo

El último ACP (**Figura 31**) fue el realizado para estudiar el grado de asociación entre las variables contenido en Fe en fémur y tibia, la absorción y retención de Fe, el pH del contenido de ciego y colon y los parámetros morfológicos de ambas secciones del intestino grueso. La varianza total explicada fue de 75,30%, y en el caso del Fe son válidas igualmente las interpretaciones dadas a los Componentes 1 y 2 que han sido explicadas en las Figuras 28 y 29 para el Ca y Mg, apreciándose nuevamente la asociación por proximidad de ambos pH y la relación inversa entre la disminución de estas dos variables con el aumento de la absorción y retención de Fe. El modelo de regresión múltiple planteado para interpretar la absorción de Fe a partir de los valores de pH del contenido del colon y la altura de las criptas del colon proximal puede apreciarse gráficamente en la presente figura. Finalmente, los contenidos de Fe en el fémur y tibia mostraron una elevada relación de proximidad con los valores obtenidos para la absorción y retención de Fe, por lo que podemos suponer que un incremento en la captación intestinal de Fe debe corresponderse con un mayor depósito de Fe en los huesos largos. Igualmente, aunque no sea de forma directa, el contenido de Fe en la fémur y tibia se asocia positivamente con los altos valores de densidad celular en el colon distal y de altura de las criptas del colon proximal, y de forma inversa con bajos valores del pH del contenido del ciego y colon.



**Figura 31.** Análisis de componentes principales (ACP) para el hierro

Los mecanismos implicados en la absorción mineral en intestino grueso mediados por la presencia de OND en la dieta pueden resumirse en dos, uno debido a la formación de complejos solubles como consecuencia del descenso del pH luminal, y un segundo mecanismo relacionado con el aumento de la superficie de captación del mineral, reflejo del efecto trófico que los OND tienen sobre la mucosa de ciego y colon. En el presente estudio la relación entre el descenso del pH en el lumen intestinal y el incremento de la absorción mineral se ha mostrado claramente para el Mg y Fe, para los cuales los grupos alimentados con las dietas prebióticas al 1,2 y 10% (4 y 6) y simbióticas (7, 8 y 9) mostraron mayores valores de absorción. Para estos dos minerales se obtuvieron altos índices de correlación entre la absorción aparente y el pH del contenido del ciego y colon, y en las ecuaciones de regresión el pH se mostró como una variable predictiva de su absorción a través de la mucosa intestinal. De igual manera, para el Ca se obtuvo un índice de correlación significativo entre el pH del contenido del colon y la absorción mineral, sin embargo el índice de correlación más alto se obtuvo con la altura de las criptas de colon distal, que fue la única de las variables estudiadas con la que se obtuvo una relación lineal creciente, y en la que los grupos prebióticos (4, 5 y 6) y simbióticos al 5 y 10% (8 y 9) mostraron mayores valores de absorción y altura de las criptas. A su vez la absorción de Mg y Fe estuvo relacionada linealmente con otros parámetros de la mucosa de colon, como la altura de las criptas en la porción proximal (Mg y Fe) y la densidad celular en colon distal (Mg).

El hecho de que ciertos minerales interaccionen entre sí estableciéndose una competencia entre ellos por los lugares de absorción puede no haberse reflejado en los resultados obtenidos en este estudio.

Es conocido que el Fe presenta una competencia con el Ca y Mn por determinados lugares de absorción en la mucosa intestinal (Lönnerdal, 1989; Hallber y Rossander-Hulthen, 1993), y que un incremento en el Ca y P en la dieta inhibe la absorción de Mg (Ohta y col., 1994a). Sin embargo para los tres minerales (Ca, Mg y Fe), se ha descrito que la incorporación a la dieta de 4'-GOS ha mejorado la absorción aparente en los grupos prebióticos y simbióticos respecto al grupo control, hecho explicable si se tiene en cuenta que para los minerales entre los que ha sido descrita tal competencia (entre Ca y Fe y entre Ca y Mg) los lugares de absorción han sido diferentes, para el Ca fue la porción distal del colon y para Mg y Fe la porción proximal.

Para el P no fueron halladas relaciones claras entre la absorción aparente y los dos factores implicados en su absorción derivados de la fermentación intestinal de 4'-GOS (pH y aumento de la superficie de absorción), como han mostrado los estudios de correlación y regresión. No obstante ha sido descrito un aumento de la absorción de este mineral en determinados grupos (probióticos, y prebióticos 1,2 y 10%) respecto al grupo control, lo que nos hace pensar en la existencia de otros factores no evaluados en el presente estudio y que favorecen la absorción de P. En este sentido Brommage y col. (1993) han descrito un aumento en la absorción de Ca, Mg y Zn relacionado con la presencia de lactulosa en la dieta. Sería presumible pensar que durante el tratamiento térmico a que se somete el preparado de leche infantil durante su procesado industrial se haya formado cierta cantidad de dicho componente (Sarriá y col., 2001), con actividad prebiótica demostrada (Sahota y col., 1982; Kawaguchi y col., 1993) que pudiera estimular la absorción de P.

Finalmente, las cuatro figuras del análisis de componentes principales reflejan gráficamente los dos mecanismos por los que el 4'-GOS mejora la absorción mineral. El *Componente 1* representa el efecto del descenso del pH en la formación de complejos solubles de Ca, Mg y Fe y fácilmente asimilables por la mucosa. El *Componente 2* resume los distintos efectos que la modificación de la mucosa de colon (aumento en la altura de criptas y de la densidad celular) tienen sobre la absorción mineral y su depósito en huesos (más evidente en la tibia) y que son debidos en última instancia a la fermentación del 4'-GOS.

## **CONCLUSIONES**

### **Conclusiones del primer objetivo:**

- 1.1. La fermentación *in vitro* de cuatro clases de oligosacáridos no digeribles por las especies de bifidobacterias *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*, muestra que el galactooligosacárido 4'-galactosil lactosa es el más adecuado para el crecimiento de dichas bacterias.
- 1.2. Las especies de bifidobacterias infantiles que muestran un mayor crecimiento tras siete días de incubación en presencia de 4'-galactosil lactosa son *B. breve* y *B. bifidum*.

### **Conclusión del segundo objetivo:**

2. Las bifidobacterias (*B. bifidum* y *B. longum*) añadidas en la fórmula infantil probiótica estudiada muestran una viabilidad por encima del nivel mínimo recomendado ( $10^6$  ufc/g) durante el periodo de consumo de la misma, estimado en 14 días.

### **Conclusión del tercer objetivo:**

3. La administración de una fórmula probiótica (*B. bifidum* y *B. longum*) desde el cuarto mes y hasta el primer año de vida eleva los niveles de bifidobacterias fecales de forma significativa a la edad de siete y nueve meses respecto a los alimentados con una fórmula infantil control.

### **Conclusiones del cuarto objetivo:**

- 4.1. Todas las dietas problema estimulan en mayor o menor medida la absorción mineral, siendo las dietas compuestas por las fórmulas infantiles prebiótica al 10% y simbiótica al 5 y 10% las que incrementan de forma más clara la absorción de Ca, Mg y Fe respecto al grupo control. La absorción de P es mayor en el grupo alimentado con la fórmula infantil prebiótica al 10%.
- 4.2. La adición a las dietas de cantidades crecientes de 4'-GOS (1,2, 5 y 10%) no produce un incremento proporcional de la absorción mineral.

### **Conclusión del quinto objetivo:**

5. La adición a ratas de probióticos (*B. bifidum* y *B. longum*) y prebióticos (4'-galactosil lactosa) en fórmulas infantiles modifica el epitelio en la porción proximal y distal del colon. Dicha modificación consiste en un incremento de la altura de la criptas y del

número de células que forman la misma (densidad celular). El uso de galactooligosacáridos a distintas concentraciones no se relaciona con una modificación en el epitelio del colon. No se observa ninguna modificación en el epitelio del ciego debido a la adición de probióticos y prebióticos a las fórmulas infantiles.

#### **Conclusiones del sexto objetivo:**

- 6.1. El descenso del pH en el contenido del ciego y colon debido a la fermentación de 4'-galactosil lactosa presente en la dieta, se relaciona de forma clara con una mayor absorción de Ca, Mg y Fe.
- 6.2. El incremento en la absorción mineral muestra un elevado índice de correlación con los parámetros histológicos medidos en la mucosa del intestino grueso. La absorción de Ca tiene lugar fundamentalmente en el colon distal, la absorción de Fe en el colon proximal, y la absorción de Mg en el colon proximal y colon distal.
- 6.3. El empleo de probióticos y prebióticos en fórmulas infantiles, incrementa el contenido de Ca, P y Fe en el fémur y en la tibia respecto al grupo alimentado con dieta control.

#### **Conclusión del séptimo objetivo:**

7. El depósito de Ca, P y Fe en el fémur y en la tibia se relaciona con el aumento de la altura de las criptas y del número de células epiteliales del colon, y con la disminución del pH en el contenido del ciego y colon. En el caso del incremento del depósito de Mg, éste sólo afecta a la tibia y se relaciona con la altura de las criptas y el incremento en el número de células epiteliales del colon.

## RESUMEN

Uno de los objetivos más importantes de la alimentación a finales del siglo XX y comienzos del XXI es la incorporación a nuestra dieta de alimentos e ingredientes que tengan efecto beneficioso a largo plazo y que nos permita mantener un estado saludable de manera prolongada. De hecho cuanto antes se incorporen en la alimentación, mayor efecto beneficioso tendrá a largo plazo. Al amparo de esta idea se ha desarrollado el concepto de alimento y/o ingrediente funcional. Destacan, por su efecto netamente positivo para la salud, los probióticos y prebióticos, y como ejemplo de ambos las bacterias del género *Bifidobacterium*, y los oligosacáridos no digeribles, respectivamente. Con el objetivo de conseguir efectos beneficiosos en la dieta a corto, medio y largo plazo, estos ingredientes han sido incorporados a las fórmulas infantiles. Aunque son evidentes los beneficios de estos ingredientes, deben ser valorados más profundamente de cara al aseguramiento de su calidad nutricional.

El presente trabajo ha sido dividido en tres estudios diferentes con el fin de hacer más clara su comprensión. En el primer estudio se evaluó la fermentación *in vitro* de diversos oligosacáridos por cuatro especies de bifidobacterias, mostrando que 4'-galactosil lactosa (4'-GOS) estimuló en mayor medida el crecimiento de las bacterias estudiadas, especialmente de *B. breve* y *B. bifidum*. En un segundo estudio, se evaluó la viabilidad de las bifidobacterias presentes en una fórmula comercial probiótica (*B. bifidum* y *B. longum*) durante un máximo de 14 días, mostrando que aunque el paso del tiempo redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) los recuentos bacterianos, éstos se mantuvieron siempre por encima del nivel recomendado ( $10^6$  células/g de producto). Posteriormente se estudió el efecto de la administración de ésta fórmula probiótica sobre la flora fecal infantil durante el primer año de vida. Los resultados mostraron que los recuentos de bifidobacterias en las heces de los niños alimentados con fórmula probiótica fueron siempre superiores a los mostrados por los niños alimentados con una fórmula estándar. Sin embargo, estos recuentos no fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores a los del grupo control hasta tres meses después de estar tomando la fórmula probiótica (correspondiente a las muestras analizadas a los 7 y 9 meses de edad).

Para la realización del tercer estudio se elaboraron un total siete dietas experimentales (1 dieta probiótica, 3 prebióticas y 3 simbióticas) y tras analizar su composición nutricional fueron administradas a un total de 54 ratas recién destetadas durante 30 días. El objetivo de este tercer estudio fue el de evaluar el efecto de los probióticos (*B. bifidum* y *B. longum*) y prebióticos (4'-GOS) aportados en la dieta sobre la absorción de los minerales mediante un balance mineral realizado en tres periodos. En general, los grupos alimentados con las dietas simbióticas al 5 y 10% fueron los que mostraron una mayor absorción de Ca, Mg, y Fe, aunque la adición de 4'-GOS al 1,2% también mostró una absorción mineral superior al grupo alimentado con la dieta control. Sin embargo, en el balance del P el grupo alimentado con la dieta prebiótica al 10% fue el que presentó unos mayores porcentajes de absorción. Con el fin de explicar los mecanismos de absorción mineral promovidos por la acción del 4'-GOS añadido a

la dietas, fueron determinados los parámetros de pH, peso y presencia mineral en los contenidos del ciego y del colon, los parámetros histológicos de altura de las criptas y densidad celular del intestino grueso, y el contenido mineral en el fémur y la tibia de los animales estudiados. Los estudios de correlación y regresión establecido entre todos los parámetros implicados en la absorción mineral desveló una relación directa entre la disminución del pH del contenido intestinal y la absorción de Ca, Mg y Fe. Sin embargo, la relación entre la absorción de estos minerales y la proliferación celular de la mucosa intestinal difirió entre los mismos. Así para el Ca se obtuvo un elevado índice de correlación con la altura de las criptas del colon distal, para el Mg existió una relación lineal entre la absorción de este mineral y la altura de las criptas en el colon proximal y con la densidad celular en el colon distal. La absorción intestinal de Fe mostró al igual que el Mg una relación lineal con la altura de las criptas en el colon proximal. En el caso del P no se observó ninguna relación clara entre su absorción y el resto de parámetros estudiados, a pesar de mostrar una absorción en determinados grupos problema significativamente superior a la observada en el grupo control. El análisis factorial reveló que el aumento en la absorción de Ca, Mg y Fe estuvo relacionado con el descenso del pH y el incremento en la proliferación del epitelio del colon. Igualmente, este estudio permitió relacionar el depósito en huesos (tibia y fémur) con la absorción y retención mineral, el pH en el contenido del ciego y colon y la proliferación del epitelio del colon.

## SUMMARY

One of the most important aims of feeding between the end of XX century and the beginning of XXI century, is the incorporation to the diet of food and ingredients which affect us beneficially to a long range and allow us to maintain a healthy state in an extended way. In fact, the sooner these ingredients are incorporated to the feeding, the higher the beneficial effect will be and at a long range. According to this idea, the concept of functional food and/or ingredient has been developed. Probiotics and prebiotics stand out for their positive effect in health. Examples of both are bacteria of the genera *Bifidobacterium* and the non-digestible oligosaccharides, respectively. With the objective to obtain beneficial effects in the diet to a short, medium and long range, these ingredients have been incorporated to infant formulas. Although the profitable effects of these ingredients are evident, they must be assessed more deeply to ensure their nutritional quality.

The present work has been divided into three studies to facilitate its understanding. In the first study the *in vitro* fermentation of some oligosaccharides by four species of bifidobacteria. It showed that 4'-galactosyllactose (4'-GOS) stimulated more intensively the bacterial growth specially of *B. breve* and *B. bifidum*. In the second study, it was evaluated the viability of bifidobacteria presents in a commercial probiotic infant formula (*B. bifidum* and *B. longum*) during 14 days as maximum. The counts were decreasing significantly ( $p < 0,05$ ) with days. However, they were kept above the recommended level ( $10^6$  cells/g of product). Later, it was studied the effect of the administration of the probiotic formula on infant fecal flora during the first year of life. The results showed that bifidobacteria fecal counts of probiotic formula fed infants were always higher than those found in control formula fed infants. However, these counts were not significantly ( $p < 0,05$ ) larger than those of the control group until three months after consuming the probiotic formula (corresponding to the samples analyzed at 7 and 9 months of age).

To carry out the third study, a total of seven experimental diets were elaborated (1 probiotic, 3 prebiotics and 3 synbiotics diets), and after analysing their nutritional composition they were administered to 54 weanling rats during 30 days. The aim of this tirad study was to evaluate the effect of probiotics (*B. bifidum* and *B. longum*) and prebiotics (4'-GOS) added to the diet on mineral absorption by mineral balance of three periods. In general, groups fed synbiotic 5 and 10% diets displayed the higher Ca, Mg, and Fe but the addition of 4'-GOS at 1,2% also showed a larger mineral absorption than that of group fed control diet. However, P balance in group fed prebiotic 10% diet displayed the highest absorption percentages. In order to explaining the mechanisms of mineral absorption induced by 4'-GOS added to the diets, the parameters of pH, weight and mineral content in the contents of cecum and colon, histologist parameters of crypts depth and cell density of the large intestine mucosa, and mineral content in femur and tibia of the rats were determined. The regression and correlation studies established among the parameters involved in the mineral absorption revealed a direct

relationship between the decrease of pH of the intestinal content and Ca, Mg and Fe absorption. Nonetheless, the relationship between the absorption of these minerals and cell proliferation of the large intestine mucosa was different among the minerals. Thus, for Ca a high factor of correlation was obtained with crypts depth in the distal colon, for Mg the lineal relationship was found between the absorption of Mg and crypts depth in the proximal colon and with cell density in the distal colon. The absorption of Fe, as previously with Mg, showed a lineal relationship with crypts depth in the proximal colon. With regard to P no clear relationship between its absorption and the other parameters was observed, in spite of showing an absorption in some groups significantly higher than in group fed control diet. The factorial analysis exhibited that the increase of Ca, Mg and Fe absorption was related with the pH decrease and the increase of cell proliferation in the epithelium of the colon. Likewise, this study allowed to relate the mineral content in bones (femur and tibia) with the mineral absorption and retention, pH of the content of the cecum and colon and the proliferation of the epithelium of colon.

- A.A.P. (American Academy of Pediatrics). 1978. Committee on nutrition. Calcium requirements in infancy and childhood. *Paediatrics*. 62: 826-834.
- A.A.P. (American Academy of Pediatrics). 1983. Committee on nutrition. Toward a prudent diet for children. *Paediatrics*. 71: 78-80.
- A.A.P. (American Academy of Pediatrics). 1985. Committee on nutrition. Supplemental foods for infants. En: *Pediatric Nutrition Handbook*. Forbes, G.B. (ed.). Illinois, USA.
- A.A.P. (American Academy of Pediatrics). 1981. Committee on nutrition. Plant fibre intake in the pediatric diet. *Paediatrics*. 67: 572-575.
- A.O.A.C. 1999. Official methods of analysis (16<sup>th</sup> edition). Association of Official Analytical Chemist, Washington D.C. USA.
- Aarsland, A.; Chinkes, D. y Wolfe, R.R. 1996. Contribution of the *novo* synthesis of fatty acids to total VLDL-triglyceride secretion during prolonged hyperglycemia/hyperinsulinemia in normal man. *J. Clin. Invest.* 98: 2008-2017.
- Abrams, S.A. y Griffin, I.J. 2001. Inulin and oligofructose and calcium absorption: Human data. En: *Proceedings of the 3<sup>d</sup> ORAFI Research Conference: Recent scientific research on inulin and oligofructose. Orafi active food ingredient*. Belgium. Pp. 26-27.
- Abrams, S.A.; Griffin, I.J. y Davila, P.M. 2002. Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(2): 442-446.
- Adlerberth, I. 1999. Establishment of a normal intestinal microflora in the newborn infant. En: *Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora*. Hanson, L.A. y Yolken, R.H. (eds.). Philadelphia, Lippincott-Raven. Pp. 63-78.
- Ahotupa, M.; Saxelin, M. y Korpela, R. 1996. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today* (Suppl. 3): 51S-52S.
- Allen, L.H. 1982. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 783-808.
- Alles, M.S.; Hartemink, R.; Meyboom, S.; Harryvan, J.L.; Van Laere, K.M.; Nagengast, F.M. y Hautvast, J.G. 1999. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative. *Am. J. Clin. Nutr.* 69(5): 980-991.
- Alles, M.S.; Katan, M.B.; Salemans, J.M.; Van Laere, K.M.; Gerichhausen, M.J.; Rozendaal, M.J. y Nagengast, F.M. 1997. Bacterial fermentation of fructooligosaccharides and resistant starch in patients with an ileal puch-anal anastomosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 1286-1292.
- Ammann, P.; Rizzoli, R. y Fleisch, H. 1986. Calcium absorption in rat large intestine in vivo: availability of dietary calcium. *Am. J. Physiol.* 251: 14-18.
- Anderson, G.H. y Draper, H.H. 1972. Effect of dietary phosphorus on calcium metabolism in intact and parathyroid ectomized rats. *J. Nutr.* 102: 1123-1132.
- Anderson, S.A.; Chinn, H.I. y Fisher, K.D. 1982. History and current status of infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 381-397.
- Andersson, B.; Porras, O.; Hanson, L.A.; Lagergard, T. y Svanborg-Eden, C. 1986. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J. Infect. Dis.* 153: 232-237.
- Andrieux, C. y Sacquet, E. 1982. Microbial flora in the digestive tract and action of lactose on mineral metabolism. *Reprod. Nutr. Dev.* 22: 387-394.
- Andrieux, C. y Sacquet, E. 1983. Effect of microflora and lactose on the absorption of calcium, phosphorus and magnesium in the hindgut of the rat. *Reprod. Nutr. Dev.* 23: 259-271.
- Andrieux, C. y Sacquet, E. 1986. Effects of amylo maize starch on mineral metabolism in the adult rat: role of the microflora. *J. Nutr.* 116: 991-998.
- Aranda, P. y Llopis, J. 1993. Minerales. En: *Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos* (ed.). *Nutrición y Dietética, aspectos sanitarios*. Madrid, España. Pp. 179-240.
- Armbrecht, H.J. y Wasserman, R.H. 1976. Enhancement of Ca<sup>++</sup> uptake by lactose in the rat small intestine. *J. Nutr.* 106: 1265-1271.
- Arroyo, L.; Cotton, L.N. y Martin, J.H. 1994. Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. *Cult. Dairy Prod. J.* 29: 20-24.
- Asahara, T.; Nomoto, K.; Shimizu, K.; Watanuki, M. y Tanaka, R. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* *serva* *Thyphimurium* infection by synbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91: 985-996.
- Aso, Y. y Akazan, H. 1992. Prophylactic effect of *Lactobacillus casei* preparation on recurrence of superficial bladder cancer. *Urol. Int.* 49: 125-129.
- Atlas, R.M. y Parks, L.C. 1993. *Handbook of microbiological media*. CRC Press, London.
- Avioli, L.V. 1988. Calcium and Phosphorus. En: *Modern Nutrition in Health and Disease*.

- 7<sup>th</sup> ed. Eds. Shils, M.E. y Young, V.R. Lea y Febigen. Philadelphia. Pp. 142-148.
- Baba, S.; Ohta, A.; Ohtsuki, M.; Hosono, A.; Adachi, T.; Hara, H. y Sakata, T. 1996. Fructooligosaccharides stimulate the absorption of magnesium from the hindgut in rats. *Nutr. Res.* 16: 657-666.
- Ballabriga, A. 1998. Nuevos aspectos de la nutrición en la infancia. *Bol. Pediatr.* 38: 264-274.
- Ballabriga, A. y Carrascosa, A. 1998. Tendencias y controversia en la composición de las fórmulas para la alimentación de los lactantes. En: Ballabriga, A., Carrascosa, A. (eds). *Nutrición en la infancia y adolescencia*. Madrid: Ediciones Ergon. Pp. 79-102.
- Balmer, S.E. y Wharton, B.A. 1989. Diet and faecal flora in the newborn. Breast milk and infant formula. *Arch. Dis. Child.* 64: 1672-1677.
- Balmer, S.E.; Hanvey, L.S.; Wharton, B.A. 1994. Diet and faecal flora in the newborn: nucleotides. *Arch. Dis. Child.* 70: 37-40.
- Bär, A. 1993. Definition of dietary fibre for nutrition labelling purposes. Conclusions of a food industry ad hoc working group on dietary fibre (Bioresco AG, Haptstrasse 63, CH-4102, Binningen).
- Barberá, R. y Farré, R. 1992. Revisión: Biodisponibilidad de los elementos traza. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 32: 331-339.
- Beachey, F.H. 1981. Bacterial adherence adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143: 325-345.
- Beerens, H.; Romond, C. y Neut, C. 1980. Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 2434-2439.
- Bengmark, S. 2000. Colonic food: pre- and probiotics. *Am. J. Gastroenterol.* 95(Suppl.1): 5 S-7S.
- Benno, Y.; Endo, K.; Shiragami, N.; Sayama, K. y Mitsuoka, T. 1987. Effects of raffinose intake on the human fecal microflora. *Bifidobacteria Microflora.* 6: 59-63.
- Benno, Y.; Sawada y Mitsuoka, T. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of faecal flora in breast-fed and bottled-fed infants. *Microbiol. Immunol.* 28: 975-986.
- Beresteijn, ECH van. 1993. Aspects of the bioavailability of calcium, phosphate and magnesium and their relation to osteoporosis and hypertension. En: Schlemmer U (ed.). *Bioavailability '93*. Nutritional, chemical and Food Proceedings. Part 2. Pp. 1-12.
- Berg, R.D. 1998. Probiotics, prebiotics or "conbiotics". *Trends Microbiol.* 6: 89-92.
- Bernasconi, P. 1986. Flora y ecosistema intestinal. *Rocador*. Barcelona, España.
- Bernet, M.F.; Brassart, D.; Neeser, J.R. y Servin, A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA-1 binds to cultured human intestinal cell-lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 35: 483-489.
- Bernet-Camard, M.F.; Lievin, V.; Brassart, D.; Neeser, J.R.; Servin, A.L. y Hudalt, S. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2747-2753.
- Bezirtzoglou, E. 1985. Contribution à l'étude de l'implantation de la flore fécale anaérobie du nouveau-né mis au monde par césarienne. Thèse, Paris-Sud.
- Bezkorovainy, A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl.2): 399S-405S.
- Bezkorovainy, A. y Miller-Catchpole, R. 1989. Biochemistry and physiology of bifidobacteria. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Bezkorovainy, A.; Kot, E.; Miller-Catchpole, R.; Haloftis, G. y Furmanov, S. 1996. Iron metabolism in bifidobacteria: a review. *Int. Dairy J.* 6: 905-916.
- Bhattathiry, E.P. 1968. Dietary carbohydrates and body lipids in rats. *Med. J. Malaya* 23(2): 123-126.
- Bielecka, M.; Biedrzycka, E. y Majkowska, A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res. Int.* 35: 125-131.
- Birge, S.J. y Aviol, R.C. 1981. Intestinal phosphate transport and alkaline phosphatase activity in the chick. *Am. J. Physiol.* 240: 384-390.
- Blanco, A. y Tellería, J.J. 1995. Factores inmunológicos en la leche humana. En: Nuevas perspectivas en nutrición infantil. Bermejo, E., López, M., Pajarón, M. (eds.). Ergón. Madrid, España. Pp. 39-49.
- Blaquiere, C. y Berthon, G. 1987. Speciation studies in relation to magnesium bioavailability. Formation of Mg(II) complexes with glutamate, aspartate, glycinate, lactate, pyroglutamate, pyridoxine, and citrate, and appraisal of their potential significance towards magnesium gastrointestinal absorption. *Inorg. Chim. Acta.* 135: 179-189.
- Blundell, J.E.; Green, S. y Burley, V.J. 1994. Carbohydrates and human appetite. *Am. J. Clin. Nutr.* 59(Suppl.3): 728S-734S.
- Boehm, G.; Lidestri, M.; Casetta, P.; Jelinek, J.; Negretti, F.; Stahl, B. y Marini, A. 2002. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 86(3): F178-181.

- Bouhnik, Y.; Flourie, B.L.; D'Agay-Abensour, P.; Pochart, G.; Gramet, M.; Durand, M. y Rambaud, J.C. 1997. Administration of transgalactooligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J. Nutr.* 127: 444-448.
- Bouhnik, Y.; Pochart, P. Marteau, P.; Arlet, G.; Goderel, I. y Rambaud, J.C. 1992. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* spp. ingested in fermented milk. *Gastroenterology*. 102: 875-878.
- Brassart, D.; Schiffrin, E.; Rochat, F.; Offord, E.A.; Macé, C. y Nesser, J.R., 1998. The future of functional foods: scientific basis and future requirements. *Lebensmittel. Technol.* 7-8: 258-266.
- Brassart, D.; Wolz, A.; Golliard, M. y Neeser, J.R. 1991. *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc-alpha-1,2-Gal bearing complex carbohydrates. *Infect. Immunol.* 59: 1605-1613.
- Brink, E.J.; Beynen, A.C.; Dekker, P.R.; Beresteijn, E.C.H.V. y Meer, R.V.D. 1992. Interaction of calcium and phosphate decreases ileal magnesium solubility and apparent magnesium absorption in rats. *J. Nutr.* 122: 580-586.
- British Nutrition Foundation. 1989. Calcium. London: British Nutrition Foundation.
- British Nutrition foundation. 1990. Complex carbohydrates in foods. London. Chapman y Hall.
- Brommage, R.; Binacua, C.; Antille, S. y Carrié, A.L. 1993. Intestinal calcium absorption in rats is stimulated by dietary lactulose and other resistant sugars. *J. Nutr.* 123: 2186-2194.
- Bronner, F. 1987. Intestinal calcium absorption; Mechanisms and applications. *J. Nutr.* 117: 1347-1382.
- Brook, I.; Barrett, C.T.; Brinkman III, C.R.; Martin, W.J. y Finegold, S.M. 1979. Aerobic and anaerobic bacterial flora of the maternal cervix and newborn gastric fluid and conjunctiva: A prospective study. *Pediatrics*. 63: 451-455.
- Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Bueno, M. y Pérez, V. 1986. Alimentación durante los dos primeros años de vida. En: *Manual de pediatría práctica*. Eds. Pombo, M. y Díaz de Santos S.A. Madrid, España.
- Bullen, C.L.; Tearle, P.V. y Stewart, M.G. 1977. The effect of "humanised" milks and supplemented breast feeding on the faecal flora of infants. *Br. Med. J.* 16.: 403-413.
- Butte, N.F., Garza, C.; Stuff, J.E. 1984. Effect of maternal diet and body composition on lactational performance. *Am. J. Clin. Nutr.* 39. 296-306.
- Campbell, J.M.; Fahey, G.C. y Wolf, B.W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, œcal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.* 127: 130-136.
- Cantor, C.R. 2000. Biotechnology in the 21<sup>st</sup> century. *TIBTECH.* 18: 6-7.
- Canzi, E.; Brighenti, F.; Casighari, M.C.; Del Puppo, E. y Ferrari, A. 1995. Prolonged consumption of inulin in ready-to-eat breakfast cereals: effects on intestinal ecosystem, bowel habits and lipid metabolism. *Cost 92, workshop on dietary fiber and fermentation in the colon*. Helsinki, April 15-17.
- Carlson, S. 1985. N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 41: 720-726.
- Carlsson, J.; Nyberg, G. y Wrethen, J. 1978. Hydrogen peroxide and superoxide radical formation in anaerobic broth media exposed to atmospheric oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 223-229.
- Casado de Frías, E., Maluenda, C. y Casado, E. 1993. Alimentación del niño. En: *Nutrición y dietética, aspectos sanitarios*. Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, España. Pp: 383-403.
- Cashman, K.D. 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *B. J. Nutr.* 87(Suppl.2): 169S-177S.
- Castagliuolo, I.; Riegler, M.F.; Valenick, L.; LaMont, J.T. y Pothoulakis, C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67: 302-307.
- Cervera, P., Clapes, J. Y Rigolfas, R. 1993. Alimentación del lactante y de la primera infancia. En: *Alimentación y dietoterapia*. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. Madrid, España. Pp: 135-138.
- Chapman, H.H. y Pratt, P.C. 1961. *Methods of analysis for soils, plant and water*. Division of Agriculture Science, University of California, USA.
- Cheng, R. y Sandine, W.E. 1989. Growth characteristics of bifidobacteria species in whey base medium. *J. dairy Sci.* 72(Suppl.1): 148S.
- Chester, M.A.; Lundblad, A.; Renlund, M. y Sjöblad. 1981. Urinary excretion of oligosaccharides by premature and full-term babies and adults. En: *Proceedings of the 6<sup>th</sup> international symposium on glycoconjugates*. Yamakawa, T.; Osawa, T. Y Handa, S. (eds.). Tokyo. Pp. 213A.
- Chevalier, B. 1997. Fisiología nutricional. En: *Nutrición infantil*. Chevalier, B. (ed.). Masson. Barcelona, España. Pp. 19-48.

- Chonan, O. y Takahashi, R. 1999.  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 linked galactooligosaccharides stimulate calcium and magnesium absorption from the large intestine. Annual Report of Yakult Central Institute for Microbiological Research. 19: 53-59.
- Chonan, O. y Watanuki M. 1995. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. J Nutr. Sci. Vitaminol. 41(1): 95-104.
- Chonan, O. y Watanuki, M. 1996. The effect of 6'-galactooligosaccharides on bone mineralization of rats adapted to different levels of dietary calcium. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 66(3): 244-249.
- Chonan, O.; Matsumoto, K. y Watanuki, M. 1995. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59(2): 236-239.
- Chonan, O.; Takahashi, R. y Watanuki, M. 2001. Role of activity of gastrointestinal microflora in absorption of calcium and magnesium in rats fed  $\beta$ 1-4 linked galactooligosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(8): 1872-1875.
- Chonan, O.; Takahashi, R.; Yasui, H. y Watanuki, M. 1996. Effects of  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 linked galactooligosaccharides on use of magnesium and calcification of the kidney and heart in rats fed excess dietary phosphorous and calcium. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60(10): 1735-1737.
- Coconnier, M.H.; Bernet, M.F.; Kerneis, S.; Chauviere, G.; Fourniat, J. y Servin, A.L. 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. FEMS Microbiol. Lett. 110: 299-305.
- Codex Alimentarius Texto abreviado. 1989. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Ed. Smith, B.L. Roma, Italia.
- Colette, C.; Gouttebel, M.C.; Monnier, L.H.; Saint-Aubert, B. y Joyeux, H. 1986. Calcium absorption following small bowel resection in man. Evidence for an adaptative response. Eur. J. Clin. Invest. 16: 271-276.
- Collins, J.K.; Thornton, G. y Sullivan, G.D. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. Int. Dairy J. 8: 487-490.
- Collins, M.D. y Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr. 69(Suppl.): 1052S-1057S.
- Commission of the European Communities. 1991. Commission Directive of 14 May 1991 on infant formulae (91/321/EEC). Official Journal of the European Communities. 4. 7. N° L 175735-49.
- Commission of the European Communities. 1997a. Reports of the scientific committee on food. Opinion on the assessment of novel foods. Part I. Opinion expressed on 7 June 1996. (thirty-ninth series). Luxembourg. 33-70.
- Commission of the European Communities. 1997b. Reports of the scientific committee on food. Opinion on the assessment of novel foods. Parts II and III. (expressed on 13 December 1996) (fortieth series). Luxembourg. 65-70.
- Committee on Nutrition. 1989. American Academy of Pediatrics. Fórmulas infantiles suplementadas con hierro. Pediatría (ed. Esp.). 28-34.
- Conrad, M.E.; Umbreit, J.N. y Moore, E.G. 1993. Rat duodenal iron-binding protein mobilferrin is a homologue of calreticulin. Gastroenterology. 104: 1700-1704.
- Conrad, M.E.; Umbreit, J.N.; Moore, E.G.; Uzel, C. y Berry, M.R. 1994. Alternate iron transport pathway. Mobilferrin and integrin in K562 cells. J Biol Chem. 269(10): 7169-7173.
- Conway, P. 1997. Development of intestinal microbiota. En: Gastrointestinal microbiology. Mackie, R.I.; White, B.A. y Isaacson, R.E. (eds.). Vol 2. New York, Chapman y Hall. Pp. 3-38.
- Cooperstock, M.S. y Zedd, A.J. 1983. Intestinal flora of infants. En: Human intestinal microflora in health and disease. Hentges, D.J. (ed.). New York, Academic Press. Pp. 79-99.
- Coppa, G.; Gabrielli, O.; Giorgi, P.; Catassi, C.; Montanari, M.P.; Varaldo, P.E. y Nichols, B.L. 1990. Preliminary study of breastfeeding and bacterial adhesion to uroepithelial cells. Lancet. 335: 569-571.
- Coppa, G.V.; Catassi, C.; Felici, L.; Gabrielle, O. y Giorgi, P.L. 1987. Acid glycohydrolases in human colostrum. Proc. XX Annual Meeting. Eur. Soc. Paediatr. Gastroenterol. Nutr. (ESPGAN), Lisbon. Pp. 90.
- Coppa, G.V.; Gabrielle, O.; Pierani, P.; Catassi, C.; Carlucci, A. y Giogi, P.L. 1993. Changes in carbohydrates composition in human milk over 4 months of lactation. Pediatrics. 91: 637-641.
- Coppa, G.V.; Gabrielle, O.; Pierani, P.; Zampini, L.; Rottoli, A.; Carlucci, A. 1991. Qualitative and quantitative studies of carbohydrates of human colostrum and mature milk. Riv. Ital. Ped. 17: 303-307.
- Coppa, G.V.; Pierani, P.; Zampini, L.; Carloni, I.; Carlucci, A. y Gabrielli, O. 1999. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. Acta Paediatr. 88(430)(Suppl.): 89S-94S.
- Coppa, G.V.; Pierani, P.; Zampini, L.; Carloni, I. y Gabrielle, O. 2001. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of

- breastfed infants by high performance anion exchange chromatography. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501: 307-314.
- Coudray, C.; Bellange, J.; Castiglia-Delahaut, C.; Rémésy, C.; Vermorel, M. y Demigné, C. 1997. Effect of soluble and partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 375-380.
- Craig, W.J. 1994. Iron status of vegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.* 59(Suppl.): 233S-237S.
- Cravioto, A.; Tello, A.; Villafan, H.; Ruiz, J.; de Vedovo, S. y Neeser, J.R. 1991. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J. Infect. Dis.* 163: 1247-1255.
- Crittenden, R.G. y Playne, M.J. 1996. Production, properties, and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 353-361.
- Crittenden RG, Morris LF, Harvey ML, Tran LT, Mitchell HL, Playne MJ. 2001. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. *J Appl Microbiol.* 90(2): 268-278.
- Crittenden, R.G. y Playne, M.J. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. 1996. *Trends in Food Sci. Technol.* 7: 353-361.
- Crociani, F.; Alessandrini, A.; Mucci, M.M. y Biavati, B. 1994. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 199-210.
- Crociani, J.; Grill, J.P.; Huppert, M. y Mallongue, J. 1995. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* 21(3): 146-148.
- Cummings, J.H. 1981. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut.* 22: 763-779.
- Cummings, J.H. 1984. Constipation, dietary fibre and the control of large bowel function. *Postgrad. Med. J.* 60: 811-819.
- Cummings, J.H. 1985. Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet.* 1: 1206-1208.
- Cummings, J.H. y Englyst, H.N. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *Am. J. Clin. Nutr. Am. J. Clin. Nutr.* 61(Suppl.): 938S-945S.
- Cummings, J.H. y Frohlich, W. 1993. Dietary fiber intakes in Europe: an overview. Commission of the European Community-DGXII-COST 92.
- Cummings, J.H. y Macfarlane, G.T. 1991. A review: the control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 443-459.
- Cummings, J.H.; Bingham, S.A.; Heaton, K.W. y Eastwood, M.A. 1992. Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of non-starch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology.* 103: 1783-1789.
- Cummings, J.H.; Pomare, E.W.; Branch, W.J.; Naylor, C.P.E. y Macfarlane, G.T. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 28: 1221-1227.
- Cummings, J.H.; Roberfroid, M.B. and members of the Paris Carbohydrate Group, Anderson, H.; Barth, C.; Ferro-Luzzi, A.; Ghos, Y.; Gibney, M.; Hermons, K.; James, W.P.T.; Korver, O.; Lairon, D.; Pascal, G. y Voragen, A.G.S. 1997. A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 417-423.
- Cumminngs, J.H.; Gibson, G.R. y Macfarlane, G.T. 1989. Quantitative estimate of fermentation in the hindgut of man. *Acta Vet. Scand.* 86: 76-82.
- Cunningham, A.S. 1979. Morbidity in breast-fed and artificially fed infants. II. *J. Pediatr.* 95: 685-689.
- Czajka-Narins, D.M. 1992. Minerals. En: Krause Nutrición y Dietoterapia. Mahan, L.K. y Arlin, M.T. (eds.). México: Interamericana. Mc Graw-Hill. Pp. 109-141.
- Czajka-Narins, D.M. 1996. Minerales. En: Nutrición y Dietoterapia, de Krause. Mahan, L.K. y Escott-Stump, S. (eds.). México: Interamericana. Mc Graw-Hill. Pp. 123-167.
- Dallman, P.R. 1986. Iron deficiency in the weanling: a nutritional problem on the way to resolution. *Acta Paediatr. Scand.* 323(Suppl): 59S-67S.
- Dallman, P.R. 1990. Progress in the prevention of iron deficiency in infants. *Act. Paediatr. Scand.* 365: 28-37.
- Darbas, H.; Jean-Pierre, H.; Rivere, M. y Boyer, G. 1991. Septicémie à *Bifidobacterium longum*. *Med. Mal. Infect.* 21: 707-709.
- Darcy-Vrillon, B.; Cherbuy, C.; Morel, M.T.; Durand, M. y Duee, P. 1996. Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Molecular Cell Biochem.* 23: 145-151.
- Dave, R.I. y Shah, N.P. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7: 31-41.
- Davidson, M.H.; Maki, K.C.; Synecki, C.; Torri, S.A. y Drennan, K.B. 1998. Effects of dietary inulin on serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 18: 503-517.
- De Bruyn, A.; Álvarez, A.P.; Sandra, P. y DeLeenheer, L. 1992. Isolation and identification of  $\beta$ -D-fructosyl-(2, 1)-D-fructose, a product of the enzymatic

- hydrolysis of the inulin from *Chicorium intybus*. Carbohydr. Res. 235: 303-308.
- De Vries, W. y Stouthamer, A.H. 1967. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. J. Bacteriol. 93(2): 574-576.
- De Vries, W. y Stouthamer, A.H. 1969. Factors determining the degree of anaerobiosis *Bifidobacterium* strains. Arch. Mikrobiol. 65: 275-287.
- Degnan, B.A. y Macfarlane, G.T. 1991. Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. FEMS Microbiol. Letters. 84: 151-154.
- Deguchi, Y.; Matsumoto, K.; Ito, T. y Watanuki, M. 1997. Effects of  $\beta$ 1-4 galactooligosaccharides administration on defecation of healthy volunteers with constipation tendency. Jpn. J. Nutr. 55: 13-22.
- Deguchi, Y.; Morishita, T. y Mutai, M. 1985. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. Agric. Biol. Chem. 49(1): 13-19.
- Delzenne, N.; Aertssens, J.; Verplaetse, H.; Roccaro, M. y Roberfroid, M. 1995. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. Life Sci. 57(17): 1579-1587.
- Delzenne, N.M. y Roberfroid, M.B. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. Lebens. M. Wiss. a. Technol. 27: 1-6.
- Demigné, C.; Levrat, A.M. y Rémésy, C. 1989. Effect of feeding fermentable carbohydrates on the cecal concentrations of minerals and their fluxes between the cecum and blood plasma in the rat. J. Nutr. 119: 1625-1630.
- Derman, D.P.; Bothwell, T.H.; Torrance, J.D.; Bezwoda, W.R.; Macphail, A.P.; Kew, M.C.; Sayers, M.H.; Disler, P.B. y Charlton, R.W. 1980. Iron absorption from maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum vulgare*) beer. Br. J. Nutr. 43: 271-279.
- Dibba, B.; Prentice, A.; Ceesay, M.; Stirling, D.M.; Cole, T.J. y Poskitt, M.E. 2000. Effect of calcium supplementation on bone mineral accretion in Gambian children accustomed to a low-calcium diet. Am J. Clin Nutr. 71: 544-549.
- Diener, M.; Helmle-Kolb, C.; Murer, H. y Scharrer, E. 1993. Effect of short-chain fatty acids on cell volume and intracellular pH in rat distal colon. Pflugers Arch. 424(3-4): 216-223.
- Dinakar, P. Y Mistry, V.V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. J. Dairy Sci. 77(10): 2854-2864.
- Diplock, A.T.; Aggett, P.J.; Ashwell, M.; Borne, F.; Fern, E.B. y Roberfroid, M. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. Br. J. Nutr. 81 (Supl.): 1S-27S.
- Djouzi, Z. y Andrieux, C. 1997. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. Br. J. Nutr. 78: 313-324.
- Djouzi, Z.; Andrieux, C.; Pelenc, V.; Somarriba, S.; Popot, F.; Paul, F. y col. 1995. Degradation and fermentation of  $\alpha$ -glucooligosaccharides by bacterial strains from human colon: *in vitro* and *in vivo* studies in gnotobiotic rats. J. Appl. Bacteriol. 79: 117-127.
- Draper, H.H.; Sie, T.L. y Bergan, J.G. 1972. Osteoporosis in aging rats induced by high phosphorus diets. J. Nutr. 102: 1133-1142.
- Drasar, B.; Jenkins, D.J.A. y Cummings, J.H. 1976. The influence of a diet rich in wheat fibre on the human faecal flora. J. Med. Microbiol. 9: 423-431.
- Drasar, B.S. y Hill, M.J. 1974. Human intestinal flora. Academic Press, New York.
- Dubey U.K. y Mistry, V.V. 1996. Growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. J. Dairy Sci. 79: 1146-1155.
- Duflos, C.; Bellaton, C.; Baghdassarian, N.; Gadoux, M.; Pansu, D. y Bronner, F. 1,25-Dihydroxycholecalciferol regulates rat intestinal calbindin-D9k post transcriptionally. J. Nutr. 126: 834-841.
- Dunne C. 2001. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. Inflamm. Bowel Dis. 7(2): 136-145.
- Eastwood, M.L. 1982. Colon structure. En: The colon: structure and function. Busto-Ferandes, L. (ed.). Plenum Medical Book Company, London, U.K. Pp. 1-16.
- Ebihara, K. y Okano, J. 1995. Comparison of bioavailability and hemoglobin repletion of ferric and ferrous iron infused into the cecum in anemic rats. Nutr. Res. 15: 889-897.
- Edwards, C.A.; Wilson, R.G.; Hanlon, L. y Eastwood, M.A. 1992. Effect of the dietary fibre content of life-long diet on colonic cellular proliferation in the rat. Gut. 33: 1076-1079.
- EGGE, H. 1993. The diversity of oligosaccharides in human milk. En: New perspectives in infant nutrition. Renner, B. y Sawatzki, G. (eds.). Stuttgart, Thieme. Pp. 12-26.
- EGGE, H.; Dell, A. y VonNicolai, H. 1983. Fucose containing oligosaccharides from human milk. Arch. Biochem. Biophys. 224: 235-253.
- Ellegård, L.; Andersson, H. y Bosaeus, I. 1997. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the

- excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 1-5.
- Englyst, H.N. y Hudson, G.J. 1996. The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry*. 57(1): 15-21.
- Englyst, H.N.; Veenstra, J. y Hudson, G.J. 1996. Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential *in vitro* predictor of the glycaemic response. *Br. J. Nutr.* 75: 327-337.
- Erickson, K.L. y Hubbard, N.E. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr.* 130(Suppl): 403S-409S.
- ESPGAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition). 1977. Committee on nutrition. Guidelines on infant nutrition. I Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scand.* (Suppl.). 262: 1-20.
- ESPGAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition). 1981. Committee on nutrition. II Recommendations for the composition of follow-up formula and Beikosts. *Acta Paediatr. Scand.* (Suppl.). 287: 1-25.
- ESPGAN (European Society of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition). 1990. Committee on nutrition. Comment on the composition of cow's milk based follow-up formulas. *Acta Paediatr Scand.* 79: 250-254.
- European Commission. 1993. Calcium. En: Nutrient and energy intakes of the European Community. Report of the Scientific Committee for Food (31<sup>st</sup> series). Luxembourg: Official Publications of the European Communities. Pp. 136-145.
- Evans, D.G.; Evans, D.J.; Moulds, J.J. y Graham, D.Y. 1988. *N*-Acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect. Immunol.* 56: 2896-2906.
- Fairweather-Tait, S.J. Magnesium bioavailability. 1999. En: Bioavailability of minerals and trace elements- members of EC Flair concerted. Fairweather-Tait, S.J. y Hurrell, R. (eds.). Action N° 10: Measurement of micronutrient absorption and status.
- FAO/OMS. 1976. Comisión del Codex Alimentarius. Normas internacionales recomendadas para alimentos para lactantes y niños. Reunión FAO/OMS. Roma.
- FAO/OMS. 1982. Comisión del Codex Alimentarius. Normas del Codex para alimentos para regímenes especiales incluidos alimentos para lactantes y niños, y relativo al código de prácticas de higiene. Rome. Italy.
- FAO/OMS. 1989. Comisión del Codex Alimentarius. Normas del Codex para alimentos para regímenes especiales incluidos alimentos para lactantes y niños, y relativo al código de prácticas de higiene. Reunión FAO/OMS; CAC (Suppl.4) Roma, 4.
- FAO/OMS/UNU. 1985. Informe de la reunión consultiva sobre "Necesidades de energía y proteínas". Serie de informes técnicos, n° 724. Ginebra, Suiza.
- FAO/WHO, 1994. Scientific working group on monitoring and management of bacterial resistance to antimicrobial agents. Geneva.
- Farré Rovira, R. y Frascuet Pons, I. 1999. Capítulo 13. Calcio, fósforo y magnesio. En: Tratado de Nutrición. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. Pp. 217-228.
- Finegold, S.M.; Attebery, H.R. y Sutter, V.L. 1974. Effect of diet on human fecal flora: comparison on Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 1456-1469.
- Fiordaliso, M.F.; Kok, N.; Desager, J.P.; Goethals, F.; Deboyser, D.; Roberfroid, M. y Delzenne, N. 1995. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. *Lipids.* 30: 163-167.
- Flegg, H.M. 1973. An investigation of the determination of total serum cholesterol by an enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.* 10: 79-84.
- Floch, M.H. y Hong-Curtiss, J. 2001. Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 3(4): 343-50.
- Floch, M.H.; Binder, H.J.; Filburn, B. y Gershengoren, W. 1972. The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1418-1426.
- Forbes, R.M. 1963. Mineral utilization in the rat. I. Effects of varying dietary rations of calcium, magnesium and phosphorus. *J. Nutr.* 80: 321-326.
- Fossati, P. y Prencipe, L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 28(10): 2077-2080.
- Frankel, W.L.; Zhang, W.; Singh, A.; Klurfeld, D.M.; Don, S.; Sakata, T.; Modlin, I. y Rombeau, J.L. 1994. Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology.* 106: 375-380.
- Fransson, G.B. y Lönnnerdal, B. 1983. Distribution of trace elements and minerals in human and cows milk. *Pediatr. Res.* 17: 912-915.
- Friedewald, W.T.; Levy, R.I. y Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative

- ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18(6):499-502.
- Fryklund, B.; Tullus, K.; Berglund, B. y Burman, L.G. 1992. Importance of the environment and the fecal flora of infants, nursing staff and parents as sources of gram-negative bacteria colonizing newborns in three neonatal wards. *Infection.* 20: 253-257.
- Fujiwara, S.; Hashiba, H.; Hirota, T. y Forstner, J.F. 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglioside GM1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 506-512.
- Fukushima, Y.; Kawata, Y.; Hara, H.; Terada, A. y Mitsuoka, T. 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int. Food Microbiol.* 42: 39-44.
- Fuller, R.A. 1989. A review: probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gaskins, H.R. y Lien, E.L. 1999. Developmental ecology of the neonatal intestine. *Introduction. Am. J. Clin. Nutr.* 69(Suppl.): 1027S.
- Gauhe, A.P.; György, P.A. y Hoover, J.R.E. 1954. Bifidus factor. Preparations obtained from human milk. *Arch. Biochem.* 48: 214-224.
- Ghoddussi, H.B. y Robinson, R.K. 1996. Enumeration of starter cultures in fermented milks. *J. Dairy Res.* 63: 151-158.
- Gibson, G.R. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* 129(Suppl.): 1438S-1441S.
- Gibson, G.R. y Collins, M.D. 1999. Concept of balanced colonic microflora, prebiotics and synbiotics. En: *Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora.* Hanson, L.A. y Yolken, R.H. (eds.). Philadelphia, Lippincott-Raven. Pp. 139-156.
- Gibson, G.R. y Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.* 130(Suppl): 391S-395S.
- Gibson, G.R. y Macfarlane, G.T. (eds.). 1995. *Human colonic bacteria. Role in physiology, pathology and nutrition.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gibson, G.R. y McCartney, A.L. 1998. Modification of the gut flora by dietary means. *Biochem. Soc. Transactions.* 26: 222-228.
- Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Gibson, G.R. y Wang, X. 1994a. Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol.* 11:491-498.
- Gibson, G.R. y Wang, X. 1994b. Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 118(1-2): 121-127.
- Gibson, G.R. y Wang, X. 1994c. Inhibitory effects of bifidobacteria on other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 412-420.
- Gibson, G.R.; Beatty, E.B.; Wang, X. y Cummings, J.H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterol.* 108: 975-982.
- Gibson, G.R.; Cummings, J.H. y Macfarlane, G.T. 1988. Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 241-247.
- Gibson, R.S. 1990. Assessment of the status of calcium, phosphorus, and magnesium. En: *Principles of nutritional assessment.* Oxford: Oxford University Press. Pp. 487-510.
- Gil, A.; Corral, E.; Martínez, A. y Molina, J.A. 1986. Effects of the addition of nucleotides to an adapted milk formula on the microbial pattern of faeces in at term newborn infants. *J. Clin. Nutr. Gastroenterology.* 1: 127-132.
- Gillooly, M.; Bothwell, T.H.; Charlton, R.W.; Torrance, J.D.; Bezwoda, W.R.; MacPhail, A.P. y Derman, D.P. 1984. Factors affecting the absorption of iron from cereals. *Br. J. Nutr.* 51: 37-46.
- Gillooly, M.; Bothwell, T.H.; Torrance, J.D.; MacPhail, A.P.; Derman, D.P.; Bezwoda, W.R.; Mills, W. y Charlton, R.W. 1983. The effects of organic acids, phytates, and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *Br. J. Nutr.* 49: 331-342.
- Gnoth, M.J.; Kunz, C.; Kinne-Saffran, E. y Rudloff, S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J. Nutr.* 130(12): 3014-3020.
- Goda, T.; Takase, S. y Hosoya, N. 1993. Maltitol-induced increase of transepithelial transport of calcium in rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39: 589-595.
- Goldblum, M.R.; Schanler, R.J.; Garza, C. y Goldman, A.S. 1989. Human milk enhances the urinary excretion of immunology factors in low birth weight infants. *Pediatr. Res.* 25: 184-188.
- Goldin, B.R.; Gorbach, S.L.; Saxelin, M.; Barakat, S.; Gualtieri, L. y Salminen, S. 1992.

- Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 37: 121-128.
- Goldman, A.S.; Garza, C.; Schanler, R.J. y Goldblum, R.M. 1990. Molecular forms of lactoferrin in stool and urine from infants fed human milk. *Pediatr. Res.* 27: 252-255.
- Goldman, A.S.; Thorpe, L.W.; Goldblum, R.M. y Hanson, L.A. 1986. Anti-inflammatory properties of human milk. *Acta Paediatr. Scand.* 75: 689-695.
- Gomes, A.M.P. y Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 139-157.
- Gómez Zavaglia, A.; Kociubinski, G.; Pérez, P. y De Antoni, G. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J. Food Prot.* 61(7): 865-873.
- Gopal, A.; Shah, N.P. y Roginski, H. 1996. Bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwissenschaft.* 51: 619-623.
- Greenberg, S.M.; Tucker, R.G.; Heming, A.E. y Matheus, J.K. 1979. Iron absorption and metabolism. I. Interrelationships of ascorbic acid and vitamin E. *J. Nutr.* 63: 19-31.
- Griffiths, E. 1987. Iron-binding proteins and host defense. En: *Iron and infection*. Bullen, J.J. y Griffiths, E. (eds.). Chichester, U.K. John Wiley and Sons. Pp. 171-209.
- Grönlund, M.M.; Salminen, S.; Mykkanen, H.; Kero, P. y Lehtonen, O.P. 1999. Development of intestinal bacterial enzymes in infants- relationship to mode of delivery and type of feeding. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 107: 655-660.
- Grütte, F.K.; Horn, R. y Haenel, H. 1965. Nutrition and biochemical microecology processes occurring in the colon of infants. *Z. Kinderheilkd.* 93: 28-39.
- Guarner, F. y Schaafsma, G. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 237-238.
- György, P.; Norris, R.F. y Rose, C.S. 1954. Bifidus factor I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 48: 193-201.
- György, P.A. 1953. Hitherto unrecognized biochemical differences between human milk and cow's milk. *Pediatrics.* 11: 98-108.
- Hallberg, L. 1981. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.* 1: 123-147.
- Hallberg, L. y Rossander-Hulthen, L. 1993. Factors influencing the bioavailability of dietary iron in man. En: *Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability. Bioavailability'93. Proceedings Part2.* Schlemmer, U. (ed.). Ettlingen, Alemania. 9-12.Pp. 23-32.
- Hallberg, L.; Bjorn-Rasmussen, E.; Howard, L. y Rossander, L. 1979. Dietary home iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scan. J. Gastroenterol.* 14: 769-779.
- Hallberg, L.; Brune, M.; Rossander-Hultén, L.; Brune, M. y Gleuep, A. 1991. Inhibition of heme-iron absorption in man by calcium. *Br. J. Nutr.* 69: 533-540.
- Hansen, R. 1985. Bifidobacteria have come to Denmark to stay. *N. Eur. Dairy J.* 51: 79-83.
- Hara, H.; Nagata, M.; Ohta, A. y Kasai, T. 1996. Increases in calcium absorption with ingestion of soluble dietary fiber, guar-gum hydrolysate, depend on the caecum in partially nephrectomized and normal rats. *Br. J. Nutr.* 76: 773-784.
- Hara, H.; Suzuki, T.; Kasai, T.; Aoyama, Y. y Ohta, A. 1999. Ingestion of guar gum hydrolysate, a soluble fiber, increases calcium absorption in totally gastrectomized rats. *J. Nutr.* 129(1): 39-45.
- Hardwick, L.L., Jones, M.R., Brautbar, M. y Lee, D.B.N. 1991. Magnesium absorption: mechanisms and the influence of vitamin D, calcium and phosphate. *J. Nutr.* 121: 13-23.
- Hartemink R. y Rombouts FM. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J. Microbiol. Methods.* 36(3):181-192.
- Hartemink, R. 1999. Prebiotic effects of non-digestible oligo- and polysaccharides. PhD. Thesis, University of Wageningen, The Netherlands.
- Hartemink, R. Kok, B.J.; Weenk, G.H. y Rombouts, F.M. 1996. Raffinose-bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods.* 27: 33-43.
- Harvey, J.A.; Zobitz, M.M. y Pak, C.Y.C. 1988. Dose dependency of calcium absorption: a comparison of calcium carbonate and calcium citrate. *J. Bone Min. Res.* 3(3):253-258.
- Haschke, F.; Nosheen, J. 1991. Nutritional anemias. *Acta Paediatr. Scand.* 374: 38-44.
- Hassinen, J.B.; Durbin, G.T.; Tomarelli, R.M. y Bernhart, F.W. 1951. The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.* 62: 771-777.
- Hata, Y.; Hara, T.; Oikawa, T.; Yamamoto, M.; Hirose, N.; Nagashima, T.; Torihama, N.; Nakajima, K.; Watabe, A. y Yamashita, M.

1983. The effects of fructooligosaccharides against hyperlipidemia. *Geriatr. Med.* 21: 156-167.
- Hata, Y.; Nakajima, K.; Hosono, Y., y Yamamoto, M. 1989. Effects of soybean oligosaccharides on human digestive organs. *J. Jpn. Soc. Clin. Nutr.* 11(1): 42-46.
- Havenaar, R. y Huis in't Ved, M.J.H. 1992. Probiotics: a general view. En: *Lactic acid bacteria in health and disease. Vol I.* Chapman y Hall, New York. Pp. 209-224.
- Hayakawa, K.; Mizutani, J.; Wada, K.; Masai, T.; Yoshihara, I. y Mitsuoka, T. 1990. Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora. *Microb. Ecol. Health Dis.* 3: 293-303.
- Hayashi, H. y Hoshi, T. 1992. Properties of active magnesium flux across the small intestine of guinea pig. *Jpn. J. Physiol.* 42: 561-575.
- Hayashi, M. 1989. Effects of 4'-galactosyllactose on lipid metabolism in human serum. *Med. Biol.* 119: 15-18.
- Heijnen, A.M.P.; Brink, E.; Lemmens, A.G. y Beynen, A.C. 1993. Ileal pH and apparent absorption of magnesium in rats fed on diets containing either lactose or lactulose. *Br. J. Nutr.* 70: 747-756.
- Heine, W.E.; Mohr, C. y Wutzke, K.D. 1992. Host-microflora correlations in infant nutrition. *Progress Food and Nutr.* 16: 181-197.
- Hekmat, S. y McMahon, D.J. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice-cream for use as probiotic food. *J. Dairy Sci.* 75: 1415-1422.
- Henriksson, A.; Khaled, A.K.D. y Conway, P.L. 1999. *Lactobacillus* colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the non-secreting stomach region. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* 11: 96-99.
- Herbst, J. 1995. Desarrollo de la succión y deglución. En: *Gastroenterología y nutrición en pediatría.* Lebenthal E (ed.). Barcelona. Salvat. Pp. 91-101.
- Hernández Rodríguez, M. 1999. Capítulo 52. Alimentación en la primera infancia. En: *Tratado de Nutrición.* Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. Pp, 809-829.
- Hill, M.J. 1995. Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology. Taylor y Francis, London.
- Hilton, E.; Rindos, P. y Isenberg, H.D. 1995. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J. Clin Microbiol.* 33: 1433.
- Hoepelman, A.I.M. y Tuomanen, E.I. 1992. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect. Immunol.* 60: 1729-1733.
- Hoffman, A.F.; Molino, G.; Milanese, M. y Belforte, G. 1983. Description and stimulation of a physiological pharmacokinetic model for the metabolism and enterohepatic circulation of bile acids in man. *J. Clin. Invest.* 71: 1003-1022.
- Holland, D.F. 1920. Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bact.* 5: 215-229.
- Holyoake, T.L.; Stott, D.J.; McKay, P.J.; Hendry, A.; MacDonald, J.B. y Lucie, N.P. 1993. Use of plasma ferritin concentration to diagnose iron deficiency in elderly patients. *J. Clin. Pathol.* 46: 857-860.
- Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 73(Supp.2): 365S-373S.
- Hopkins, M.J.; Cummings, J.H. y Macfarlane, G.T. 1998. Interspecies differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *J. Appl. Microbiol.* 85: 381-386.
- Hoshi, S.; Sakata, T.; Mikuni, K.; Hashimoto, H. y Kimura, S. 1994. Galactosylsucrose and xylosylfructoside alter digestive tract size and concentrations of cecal organic acids in rats fed diets containing cholesterol and cholic acid. *J. Nutr.* 124: 52-60.
- House, W.A. y Van Campen, D. 1971. Magnesium metabolism of sheep fed different levels of potassium and citric acid. *J. Nutr.* 101: 1483-1492.
- Howard, M.D.; Gordon, D.T.; Garleb, K.A. y Kerley, M.S. 1995a. Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide, and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. *J. Nutr.* 125: 2604-2609.
- Howard, M.D.; Gordon, D.T.; Pace, L.W.; Garleb, K.A. y Kerley, M.S. 1995b. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *J. Pediatr. Gastroenterol.* 21: 297-303.
- Hudault, S.; Lievin, V.; Bernet-Camard, M.F. y Servin, A.L. 1997. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513-518.
- Hughes, D.B. y Hoover, D.G. 1995. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *J. Dairy Sci.* 78: 268-276.
- Hurley, L.S. 1985. Trace elements in prenatal and neonatal development: zinc and manganese. En: *Trace elements in nutrition of children.* Chandra RK (ed.). New York: Nestle nutrition. Workshop. Series n° 8. Raven Press. Pp. 121-135.

- Ichikawa, H. y Sakata, T. 1998. Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous infusion of ammonia or short-chain fatty acids is nonadditive. *J. Nutr.* 128: 843-847.
- Ingham, S.C. 1999. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. *J. Food Prot.* 62(1): 77-80.
- Ishibashi, N. y Shimamura, S. 1993. *Bifidobacteria*: research and development. *Jpn. Food Technol.* 47: 126-135.
- Ishikawa, F.; Takayama, H.; Matsumoto, K.; Ito, M.; Chonan, O.; Deguchi, Y.; Kikuchi-Hayakawa, H. y Watanuki, M. 1995. Effects of  $\beta$ 1-4 linked galactooligosaccharides on human fecal microflora. *Bifidus.* 9: 5-18.
- Ito, M. y Kimura, M. 1993. Influence of lactose of fecal microflora in lactose maldigestion. *Microbial. Ecol. Health Dis.* 6: 73-76.
- Ito, M.; Deguchi, Y.; Matsumoto, K.; Kimura, M.; Onodera, N. y Yajima, T. 1993. Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39: 635-640.
- Ito, M.; Deguchi, Y.; Miyamori, A.; Matsumoto, K.; Kikuchi, H.; Kobayashi, Y.; Yajima, T. Y Kant, T. 1990. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human fecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microb. Ecol. Health Dis.* 3: 285-292.
- Ito, M.; Ohno, T. y Tanaka, R. 1992. A specific DNA probe for identification of *Bifidobacterium breve*. *Micriol. Ecol. Health Dis.* 5: 185-192.
- IUB-IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) y JCBN (Joint Commission on Biochemical Nomenclature). 1982. Abbreviated terminology of oligosaccharide chains. Recommendations 1980. *J. Biol. Chem.* 257(7): 3347-3351.
- Jack, R.W.; Tagg, J.R. y Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171-200.
- Janson, J.M.; Nieburg, P. y Marks, J.S. 1984. Mortality and infectious disease associated with infant-feeding practices in developing countries. *Pediatrics.* 74: 702-727.
- Jenkins, D.J.A.; Wolever, T.M.S. y Jenkins, A. 1991. Specific types of colonic fermentation may raise low-density-lipoprotein-cholesterol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 141-147.
- Jenkins, D.J.A.; Wolever, T.M.S.; Taylor, R.H.; Barker, H.M.; Fielden, H.; Baldwin, J.M.; Bowling, A.C.; Newman, H.C.; Jenkins, A.L. y Goff, D.V. 1981. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 362-366.
- Johnson, D.B. 1997. Nutrition in infancy: evolving views on recommendations. *Nutrition today* 32(2): 63-68.
- Kaila, M.; Isoulari, E.; Soppi, E.; Virtanen, E.; Laine, S. y Arvilommi, H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by human *Lactobacillus* strain. *Pediatr. Res.* 32: 141-144.
- Kajiwara, S.; Gandhi, H. y Ustunol, Z. 2002. Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *J. Food Prot.* 65(1): 214-218.
- Kanamori, Y.; Hashizume, K.; Sugiyama, M.; Morotomi, M. y Yuki, N. 2001. Combination therapy with *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus casei*, and galactooligosaccharides dramatically improved the intestinal function in a girl with short bowel syndrome. A novel synbiotics therapy for intestinal failure. *Digest. Dis. Sci.* 46(9): 2010-2016.
- Karbach, U. 1989a. Magnesium transport across colon ascendens of the rat. *Dig. Dis. Sci.* 34: 1825-1831.
- Karbach, U. 1989b. Cellular-mediated and diffusive magnesium transport across the descending colon of rat. *Gastroenterology.* 96: 1282-1289.
- Karbach, U. Y Rimmel, W. 1990. Cellular and paracellular magnesium transport across the terminal ileum of the rat and its interaction with the calcium transport. *Gastroenterology.* 98: 985-992.
- Kawaguchi, M.; Tashiro, Y.; Adachi, T. y Tamura, Z. 1993. Changes in intestinal condition, fecal microflora and composition of rectal gas after administration of fructooligosaccharide and lactulose at different doses. *Bifidobacteria microflora.* 12: 57-68.
- Kawase, K. 1982. Effects of nutrients on the intestinal microflora of infants. *Jpn. J. Dairy Food Sci.* 31: 241-243.
- Kennefick, S. y Cashman, K.D. 2000. Investigation of an *in vitro* model for predicting the effect of food components on calcium availability from meals. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 51: 45-54.
- Kikuchi, H.; Andrieux, C.; Riottot, M.; Bensaada, M.; Popot, F.; Beaumatin, P. y Szylit, O. 1996. Effect of 2 levels of transgalactosylated oligosaccharide intake in rats associated with human faecal microflora on bacterial glycolytic

- activity, end-products of fermentation and bacterial steroid transformation. *J. Appl. Bacteriol.* 80(4): 439-446.
- Kikuchi-Hayakawa, H.; Kimura, M. y Watanuki, M. 1997. Adaptation of rate of organic acid production of hindgut bacteria to chronic intake of galactooligosaccharide in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43: 357-368.
- Kim, M. y Atallah, M.T. 1993. Intestinal solubility and absorption of ferrous iron in growing rats are affected by different dietary pectins. *J. Nutr.* 123(1): 117-124.
- Klaenhammer, T.R. y Kullen, M.J. 1999. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol.* 50(1-2): 45-57.
- Klaver, F.A.M.; Kingma, F. y Weerkamp, A.H. 1993. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk and Dairy J.* 47:151-164.
- Kleessen, B.; Bunke, H.; Tovar, K.; Noack, J. y Sawatzki, G. 1995. Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr.* 84: 1347-1356.
- Kleessen, B.; Sykura, B.; Zunft, H.J. y Blaut, M. 1997. Effects of inulin and lactose on faecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1397-1402.
- Kobata, A.; Yamashita, K. y Tachibana, Y. 1978. Oligosaccharides from human milk. *Methods Enzymol.* 50: 216-220.
- Kok, N.; Roberfroid, M. y Delzenne, N. 1996a. Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br. J. Nutr.* 76: 881-890.
- Kok, N.N.; Taper, H.S. y Delzenne, N.M. 1998b. Oligofructose modulates lipid metabolism alterations induced by fat-rich diet in rats. *J. App. Toxicol.* 18: 47-53.
- Kok, R.G.; de Waal, A.; Schut F.; Welling, G.W.; Weenk, G. y Hellingwerf, K.J. 1996b. Specific detection and analysis of a probiotic Bifidobacterium strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3668-3672.
- Kopp-Hoolihan L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *J. Am. Diet Assoc.* 101(2): 229-238
- Korshunov, U.M.; Sinitsyna, N.A.; Ginodman, G.A. y Pinegin, B.V. 1985. Correction of intestinal microflora in chemotherapeutic dysbacteriosis using bifidobacterial and lactobacterial autologous strains. *Z. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 9: 20-25.
- Koruda, M.J.; Rolandelli, R.H. y Settle, R.G. 1988. Effect of parenteral nutrition supplemented with short-chain fatty acids on adaption to massive small bowel resection. *Gastroenterology.* 95: 715-720.
- Krause, M.V. y Mahan, L.K. 1979. Food and diet therapy (6<sup>th</sup> ed.). Saunders, W.B. (ed.). Philadelphia. USA.
- Kripke, S.A.; Fox, A.D.; Berman, J.M.; Settle, R.G. y Rombeau, J.L. 1989. Stimulation of intestinal mucosal cells in miniature swine may not be mediated primarily by fermentation. *J. Nutr.* 122: 906-916.
- Kruis, W.; Schutz, E.; Fric, P.; Fixa, B.; Judmaier, G. y Stolte, M. 1997. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11: 853-858.
- Kuhn, R. 1958. Bifidus factors of human breast milk. *Proc. Soc. Chem. India XVII.* 18: 37.
- Kullen, M.J. y Klaenhammer, T.R. 1999. Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. En: Probiotics: A critical review. Tannock, G.W. (ed.). Horizon Scientific Press. Norfolk, U.K. Pp. 65-84.
- Kullen, M.J.; Amann, M.M.; O'Shaughnessy, W.; O'Sullivan, D.J.; Bustaa, F.F. y Brady, U. 1997. Differentiation of ingested bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J. Nutr.* 127: 89-94.
- Kullen, M.J.; Khil, J.; Busta, F.F.; Gallaher, D.D. y Brady, L.J. 1998. Carbohydrate source and bifidobacteria influence the growth of *Clotridium perfringes in vivo* and *in vitro*. *Nutr. Res.* 18: 1889-1897.
- Kunz, C. y Lönnerdal, B. 1992. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatr.* 81: 107-112.
- Kunz, C.; Rudloff, S.; Schad, W. y Braun, D. 1999. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br. J. Nutr.* 82(5): 391-399.
- Kurmann, J.A. y Rasic, J.L. 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. En: Therapeutic properties of fermented milks. Robinson, R.K. (ed.). Elsevier Applied Food Sciences. London. Pp. 117-158.
- La Vergne, E.; Burdin, J.C.; Schmitt, J. y Manciaux, M. 1959. Sensibilité de *B. bifidum* à onze antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur.* 97(1): 104-107.
- Langendijk, P.S.; Schut, F.; Jansen, G.J.; Raangs, G.C.; Kamphuis, G.R.; Wilkinson, M.H.F. y Welling, G.W. 1995. Quantitative fluorescence *in situ* hybridisation of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 151-187.
- Langhendries, J.P.; Detry, J.; Van Hees, J.; Lamboray, J.M.; Darimont, J.; Mozin, M.J., Secretin, M.C. y Senterre, J. 1995. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy

- full-term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21: 177-181.
- Lankaputhra, W.E.V. y Shah, N.P. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 30: 2-7.
- Lankaputhra, W.E.V.; Shah, N.P. y Britz, M.L. 1996. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft.* 51: 65-70.
- Laroia, S. y Martin, J.H. 1991. Effect of pH on survival of *bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products J.* 26: 13-21.
- Lee, C.J., Cheaney, O.M., Smith, C.A.; Marlatt, A.L.; Skerski, G.M. y Packett, L.V. 1972. Effects of dietary protein and calcium level on utilization of protein and minerals in rats. *Nutr. Rep. Int.* 5: 321-332.
- Lee, P.C. 1983. Digestibility of starches and modified food starches. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2(Suppl.): 252S-259S.
- Levitt, M.D. y Ingelfinger, F.J. 1968. Hydrogen and methane production in man. *Ann. NY Acad. Sci.* 150: 75-81.
- Levrat, M.A.; Rémésy, C. y Demigné, C. 1991. High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. *J. Nutr.* 121: 1730-1737.
- Lewis, R. y Gorbach, S. 1972. Modification of bile acids by intestinal bacteria. *Arch. Intern. Med.* 130: 545-549.
- Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. BOE núm. 298, de 14 de diciembre de 1999. Pp. 43088-43099.
- Lifschitz, C.H.; Smith, E.O. y Garza, C. 1983. Delayed complete functional lactase sufficiency in breast-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2: 478-482.
- Linder, M.C. 1988. Nutrición y metabolismo de los elementos traza. En: *Nutrición, aspectos metabólicos y clínicos.* Linder, M.C. (ed). Eunsa. Pamplona, España. Pp. 189-216.
- Lindsquist, B. 1987. Requerimientos dietéticos de minerales y su regulación homeostática en la infancia, con especial referencia a los elementos traza. En: *Avances en nutrición de la infancia 2.* UNIASA (Granada). Jarpyo Editores S.A. Madrid, España.
- Livesey, G. 1992. The energy values of dietary fibre and sugar alcohols for man. *Nutr. Res. Rev.* 5: 61-84.
- Lönnerdal, B. 1989. Dietary factors affecting trace element absorption in infants. *Act. Paed. Sc. (Suppl.).* 351: 109-113.
- Lönnerdal, B. 1997. Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiol. Rev.* 77(3): 643-669.
- Lönnerdal, B.; Yuen, M. y Huang, S. 1994. Calcium, iron, zinc, copper and manganese bioavailability from infant formulas and weaning diets assessed in rats pups. *Nutr. Res.* 14(10): 1535-1538.
- Lönnerdal, B.; Yuen, M.; Glazier, C. y Litov, R.E. 1993. Magnesium bioavailability from human milk, cow milk, and infant formula in suckling rat pups. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 392-397.
- Lopez, H.W.; Coudray, C.; Bellanger, J.; Levrat-Verny, M.A.; Demigne, C.; Rayssiguier, Y. y Remesy, C. 2000. Resistant starch improves mineral assimilation in rats adapted to a wheat bran diet. *Nutr. Res.* 20(1): 141-155.
- Lopez, H.W.; Coudray, C.; Bellanger, J.; Younes, H.; Demigné, C. y Rémésy, C. 1998. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J. Nutr.* 128: 1192-1198.
- Lopez, H.W.; Levrat, M.A.; Guy, C.; Messenger, A.; Demigné, C. y Rémésy, C. 1999. Effects of soluble corn bran arabinoxylans on cecal digestion, lipid metabolism, and mineral balance (Ca, Mg) in rats. *J. Nutr. Biochem.* 10: 500-509.
- Lozoff, B. y Brittenham, G.M. 1986. Behavioral aspects of iron deficiency. *Prog. Haematol.* 14: 23-53.
- Lozoff, B.; Jimenez, E. y Wolf, A.W. 1991. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *N. Eng. J. Med.* 325: 687-694.
- LSRO (Life Sciences Research Office). 1981. Effect of Dietary Factors on Skeletal Integrity in Adults: Calcium, Phosphorus, Vitamin D and Protein. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Md.
- Lu, Z.X.; Gibson, P.R.; Muir, J.G.; Fielding, M. y O'Dea, K. 2000. Arabinoxylan fiber from by-product of wheat flour processing behaves physiologically like a soluble, fermentable fiber in the large bowel of rats. *J. Nutr.* 130: 1984-1990.
- Lucas, A.; Morley, R.; Cole, T.; Lister, G. y Leeson-Payne, C. 1992. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet.* 339: 261-264.
- Lucas, A.; Morley, R.; Cole, T.J.; Gore, S.M.; Lucas, P.J.; Crowle, P.; Pearce, R.; Boon, A.J. y Powell, R. 1990. Early diet in preterm babies developmental status at 18 months. *Lancet.* 335: 1477-1481.
- Lundequist B, Nord CE, Winberg J. 1985. The composition of the fecal microflora in breastfed and bottled fed infants from

- birth to eight weeks. *Acta Paediatr. Scand.* 74: 45-51.
- Luo, J.; Rizkala, S.; Alamowitch, C.; Boussairi, A.; Blayo, A.; Barry, J.; Laffitte, A.; Guyon, F.; Bornet, F.R.J. y Slama, G. 1996. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 939-945.
- Lutz, T. y Scharrer, E. 1991. Effects of short-chain fatty acids on calcium absorption in the rat colon. *Exp. Physiol.* 76: 615-618.
- Lutz, T.; Wurmlli, R. y Scharrer, E. 1991. Short-chain fatty acids stimulate magnesium absorption by the colon. En: *Magnesium- a relevant ion.* B. Lasserre y J. Durlach (eds.). London. John Libbey. Pp. 131-137.
- Macfarlane, G.T. y Cummings, J.H. 1991. The colonic flora, fermentation, and large bowel digestive function. En: *The large intestine: physiology pathophysiology and disease.* Phillips, S.F.; Pemberton, J.H. y Shorter, R.G. (eds.). Raven Press, New York. Pp. 51-92.
- Macfarlane, G.T. y Englyst, H.N. 1986. Starch utilization by the human large intestinal microflora. *J. Appl. Bacteriol.* 60(3): 195-201.
- Macfarlane, G.T.; Cummings, J.H. y Allison, C. 1986. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1647.
- Macfarlane, G.T.; Cummings, J.H.; Macfarlane, S. y Gibson, G.R. 1989a. Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3stage continuous culture system. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 521-527.
- Macfarlane, G.T.; Gibson, G.R. y Cummings, J.H. 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the colon. *J. Appl. Bacteriol.* 72: 57-64.
- Macfarlane, G.T.; Gibson, G.R.; Drasar, B.S. y Cummings, J.H. 1995. En: *Gastrointestinal and oesophageal pathology.* Whitehead, R. (ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh. Pp. 249-274.
- Macgregor, R.R. y Tunnessenn, W.W. 1973. The incidence of pathogenic organisms in the normal flora of the neonates external ear and nasopharynx. *Clin. Pediatr.* 12: 697-700.
- Macy, J.M. y Probst, I. 1979. The biology of gastrointestinal bacteroides. *Annu. Rev. Microbiol.* 33: 561-594.
- Majamaa, H.; Isouleri, E.; Saxelin, M. y Vesikari, T. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20: 333-338.
- Malin, M.; Verronen, P.; Mykkanen, H.; Salminen, S. y Isouleri, E. 1996. Increased bacterial urease activity in faeces in juvenile chronic arthritis: evidence of altered intestinal microflora?. *Br. J. Rheumatol.* 35: 689-694.
- Marsh, P. y Martin, M. 1992. *Oral microbiology.* Chapman y hall, London 3<sup>rd</sup> ed.
- Marteau, P. y Rambaud, J.C. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 207-220.
- Martí-Hennerberg, C. 1993. Nutrición en pediatría. En: *Tratado de pediatría.* Ed. Espaxs. Cruz Hernandez, M. Barcelona, España. Capítulo 52. Pp: 639-654.
- Martinez, I.; Santaella, M.; Ros, G. y Periago, M.J. 1998. Content and *in vitro* availability of Fe, Zn, Mg, Ca and P in homogenized fish-based weaning foods after bone addition. *Food Chem.* 63(3): 299-305.
- Martinez, M.J. y Hernandez, M. 1993. Necesidades nutricionales en la primera infancia. En: *Alimentación infantil.* 2ed. Díaz de Santos. Madrid, España. Pp. 25-31.
- Martinez-Torres, C. y Layrisse, M. 1979. Effect of amino acids on iron absorption from a staple vegetable food. *Blood.* 35: 669-682.
- Marx, S.P.; Winkler, S. y Hartmeier, W. 2000. Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* 182: 163-169.
- Matsumoto, K. 1990. Characterization and utilization of  $\beta$ -galactosidases from lactobacilli and bifidobacteria. *Jpn. J. Dairy Food Sci.* 39: 239-248.
- Medina, L.M. y Jordano, R. 1994. Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. *J. Food Prot.* 56: 731-733.
- Melero C. 1989. Alimentación en la segunda infancia. En: *Vademecum de Dietética Infantil* 2<sup>da</sup> ed. Nogales, A. (ed.). Ediciones CEA. Madrid. España. Pp.75-81.
- Mellander, O. 1950. The physiology importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Soc. Med. Upsal.* 55: 247-255.
- Meneely, R.; Leeper, L. y Ghishan, F.K. 1982. Intestinal maturation: in vivo magnesium transport. *Pediatr. Res.* 16: 295-298.
- Metchnikoff, E. 1907. *The prolongation of life. Optimistic studies.* London. William Heinemann.
- Mevissen-Verhage, E.A.E.; Marcelis, J.H.; Harmsen-van Amerongen, W.C.M.; De Vos, M:N. y Verhoef, J. 1987. *Bifidobacterium, Bacteroides, and*

- Clostridium* spp. fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *J. Clin. Microbiol.* 2: 285-289.
- Meyer, H.P.; Käppeli, O. y Fiechter, A. 1985. Growth control in microbial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 299-319.
- Michaelsen, K.F.; Astrup, A.V.; Mosekilde, L.; Richelsen, B.; Schroll, M. y Sorensen, O.H. 1994. The importance of nutrition for the prevention of osteoporosis. *Ugeskr Laeger.* 156: 958-960.
- Millar, M.R.; Bacon, C.; Smith, S.L.; Walker, V. y Hall, M.A. 1993. Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus* GG. *Arch. Dis. Child.* 69: 483-487.
- Miller, D.D. 1993. Calcium in the diet: food sources, recommended intakes, and nutritional bioavailability. *Adv. Food Nutr. Res.* 33: 103-106.
- Miller, J.B., Bull, S., Miller, J. and McVeagh, P. 1994. The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variations in monosaccharide components. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 19: 371-376.
- Miller, T.L.; Wolin, M.J.; de Macario, E.C. y de Macario, A.J.L. 1982. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human faeces. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 227-232.
- Miller-Catchpole, R.; Kot, E.; Haloftis, G.; Furmanov, S. y Bezkorovainy, A. 1997. Lactoferrin can supply iron for the growth of *Bifidobacterium breve*. *Nutr. Res.* 17: 205-213.
- Milner, J.A. 1990. Trace mineral in the nutrition of children. *J. Pediatr.* 117(Suppl.): 147S-155S.
- Milner, J.A. 2000. Functional foods: the US perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(Suppl.): 1654S-1659S.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. 1995. Tablas de composición de alimentos españoles. Ed. Secretaría general técnica. Centro de publicaciones. Madrid, España.
- Mital, B.K. y Carg, S.K. 1992. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. *Food Rev. Int.* 8(3): 347-389.
- Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora.* 1(1): 1128.
- Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora.* 3(1): 11-28.
- Mitsuoka, T. 1989. Taxonomy and ecology of the indigenous intestinal bacteria. En: *Recent advances in microbial ecology.* Hatton, T. (ed.). Tokyo: Japan Scientific Societies Press. Pp. 493-498.
- Mitsuoka, T. 1990c. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.* 6: 263-267.
- Mitsuoka, T. y Kaneuchi, C. 1977. Ecology of the bifidobacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 1799-1810.
- Mitsuoka, T.; Hidaka, H. y Eida, T. 1987. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Die Nahrung.* 31: 427-436.
- Modler, H.W. 1994. Bifidogenic factors- source, metabolism and applications. *Int. Dairy J.* 4: 383-407.
- Modler, H.W.; McKellar, R.C. y Yaguchi, M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 23: 29-41.
- Molina, J.A. y Maldonado, J. 1993. Características de la digestión y metabolismo en el lactante. En: *Tratado de pediatría.* Ed. Espaxs. Cruz Hernández, M. Barcelona, España. Capítulo 53. Pp: 655-663.
- Molis, C.; Flourie, F.; Ouarne, F.; Galling, M.F.; Lartigue, S.; Guibert, A.; Bornet, F. y Galmiche, J.P. 1996. Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 64: 324-328.
- Molly, K.; Vande Woestyne, M. y Verstrate, W. 1993. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a stimulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotech.* 39: 254-258.
- Monsen, E.R. y Cook, J.D. 1976. Food iron absorption in human subjects IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 1142-1148.
- Moore, W.E.C. y Holdeman, L.V. 1974. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Environ. Microbiol.* 27: 961-979.
- Moreno, Y.; Hernández, M.; Collado, M.C. y Hernández, E. 2000. Aplicación de fluorocromos para el estudio de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en productos lácteos. *Ars. Pharmaceutica.* 41(3): 278-292.
- Morgan, B. y Winick, M. 1980. Effects of environmental stimulation of brain *N*-acetylneuraminic acid content and behaviour. *J. Nutr.* 46: 425-432.
- Moro, E. 1900a. Über die nach Gram-farbbaaren bacillen des säuglingsstuhles. *Wien. Lin. Wschr.* 13: 114.
- Moro, G.; Minoli, I.; Mosca, M.; Fanaro, S.; Jelinek, J.; Stahl, B. y Boehm, G. 2002. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol.* 34: 291-295.
- Moughan, P.J.; Birtles, M.J.; Cranwell, P.D.; Smith, W.C. y Pedraza, M. 1992. The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. En: *Nutritional triggers for health and in disease.* Simopoulos, A.P. (ed.). Basel, Switzerland, Karger. Pp. 40-113.

- Mountzouris, K.; McCartney, A.L. y Gibson, G.R. 2002. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *B. J. Nutr.* 87: 405-420.
- Moya, M.; Cortes, E. y Ballester, I. 1990. Suplementación vitamínica y mineral en la lactancia. *Actualidad Nutricional.* 4: 23-28.
- Mozaffar, Z.; Nakanishi, K.; Matsuno, R. y Kamikuro, T. 1984. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidasas from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.* 48: 3035-3061.
- Murono, K.; Fujita, K.; Yoshikawa, M.; Saijo, M.; Inyaku, F.; Kakehashi, H. y Tsukamoto, T. 1993. Acquisition of nonmaternal enterobacteriaceae by infants delivered in hospitals. *J. Pediatr.* 122: 120-125.
- Nagengast, F.M.; Hectors, M.P.C.; Buys, W.C.A.M. y van Tongeren, J.H.M. 1993. Inhibition of secondary bile acid formation in the large intestine by lactose in healthy subjects of two different age groups. *Eur. J. Clin. Invest.* 18: 56-61.
- Naito, H. y Susuki, H. 1974. Further evidence for the formation *in vivo* of phosphopeptides in the intestinal lumen for dietary  $\beta$ -casein. *Agr. Biol. Chem.* 38: 1543-1545.
- Nakakuki, T. 1993. Oligosaccharides. Production, properties and applications. Nakakuki, T. (ed.). *Japanese Technology Reviews.* Vol 2. 3. Gordon y Breach Sci. Publishers.
- Nanji, A.A.; Khettry, U. y Hossein Sadrzadeh, S.M. 1994. *Lactobacillus* feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205: 243-247.
- Narimiya, M.; Yokoi, K.; Tajima, N.; Sakai, O.; Ikeda, Y. y Takayama, H. 1996. The effect of  $\beta$ 1-4 galactooligosaccharides on fecal flora in non insulin dependent diabetic patients with constipation. *Jpn. J. Clin. Nutr.* 18: 44-50.
- Negretti de Brätter, V.; Brätter, P.; Mohn, L. y col. 1995. Minerales y oligoelementos. Aspectos generales y análisis clínico. Fundación Bertelsmann, ed. Gütersloh. Pp. 3-13.
- Nellans, H. y Goldsmith, R. 1981. Transepithelial calcium transport by rat caceum: high efficiency absorptive site. *Am. J. Physiol.* 240: 424-531.
- Neut, C.; Lesieur, V.; Beerens, H. y Romond, C. 1985a. Changes in the composition of infant fecal flora during weaning. *Microecol. Ther.* 15: 303.
- Neut, C.; Pathak, J.; Romond, C. y Beerens, H. 1985b. Rapid detection of *Clostridium perfringens*: comparison of lactose sulfite broth with tryptose-sulfite-cycloserine agar. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68(5): 881-883.
- Newburg, D.S. 2000. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30(Suppl.): 8S-17S.
- Newburg, D.S. y Neubauer, S.H. 1995. Carbohydrates in milk. En: *Handbook of milk composition.* Jensen, R.G. (ed.). Academic Press, San Diego, C.A. Pp. 273-349.
- Newburg, D.S. 1997. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria?. *J. Nutr.* 127(Suppl.): 980S-984S.
- Nielsen, F.H. 1991. Trace and ultratrace elements in health and disease. *Comprehensive Therapy.* 17(3): 20-26.
- Nishizawa, Y. 1960. Physiological activity of bifidobacteria. *Shonika Shinryo.* 23: 1213-1218.
- Nommsen, L.A., Lovedaly, C.A., Heinig, M.J.; Lönnerdal, B. y Dewey, K.G. 1991. Determinants of energy, protein, lipid and lactose concentrations in human milk during the first 12 months of lactation: The Darling Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 457-465.
- Nord, C.E. y Kager, L. 1984. The normal flora of the gastrointestinal tract. *Neth. J. Med.* 27: 249-252.
- NRC (National Research Council). 1978. Nutrient requirements of laboratory animals. 3<sup>rd</sup> ed. National academy of sciences. Washington D.C. USA.
- NRC (National Research Council). 1991. Raciones dietéticas recomendadas. 1<sup>a</sup> edición española de la 10<sup>a</sup> edición original. Ediciones Consulta, S.A. Barcelona. España.
- O'Dell, B.L. 1985. Bioavailability and interactions among trace elements. En: *Trace elements in nutrition of children.* Chandra, R.K. (ed.). Nestlé Nutrition, Vevey/Raven Press. Nueva York, USA. 41-62.
- O'Dell, B.L. 1989. Mineral interactions relevant to nutrient requirements. *J. Nutr.* 119: 1832-1838.
- O'Sullivan, M.G.; Thorton, G.; O'Sullivan, G.C. y Collins, J.K. 1992. Probiotic bacteria: myth or reality?. *Trends Food Sci. Technol.* 3: 309-314.
- Ohta A. 1999. Stimulatory effects of indigestible carbohydrates (fructooligosaccharides) on mineral absorption. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 52: 387-395.
- Ohta, A.; Baba, S.; Ohtsuki, M.; Hirayama, M. y Adachi, T. 1998d. Comparison of the nutritional effects of FOS of different sugar chain length in rats. *Nutr. Res.* 18(1): 109-120.
- Ohta, A.; Baba, S.; Ohtsuki, M.; Taguchi, A. y Adachi, T. 1996. Prevention of coprophagy modifies magnesium absorption in rats fed with fructo-

- oligosaccharides. *Br. J. Nutr.* 75(5): 775-784.
- Ohta, A.; Baba, S.; Ohtsuki, M.; Takizawa, T.; Adachi, T. y Hara, H. 1997. *In vivo* absorption of calcium carbonate and magnesium oxide from the large intestine in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43(1): 35-46.
- Ohta, A.; Baba, S.; Takizawa, T. y Adachi, T. 1994a. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium in the magnesium-deficient rat model. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 40(2): 171-180.
- Ohta, A.; Motohashi, Y.; Ohtsuki, M.; Hirayama, M.; Adachi, T. y Sakuma, K. 1998c. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9k differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. *J. Nutr.* 128(6): 934-939.
- Ohta, A.; Ohtsuki, M.; Baba, S.; Adachi, T.; Sakata, T. y Sakaguchi, E. 1995a. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J. Nutr.* 125(9): 2417-2424.
- Ohta, A.; Ohtsuki, M.; Baba, S.; Takizawa, T.; Adachi, T. y Kimura, S. 1995b. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41(3): 281-291.
- Ohta, A.; Ohtsuki, M.; Hosono, A.; Adachi, T.; Hara, H. y Sakata, T. 1998b. Dietary fructooligosaccharides prevent osteopenia after gastrectomy in rats. *J. Nutr.* 128(1): 106-110.
- Ohta, A.; Ohtsuki, M.; Uehara, M.; Hosono, A.; Hirayama, M.; Adachi, T. y Hara, H. 1998a. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *J. Nutr.* 128(3): 485-490.
- Ohta, A.; Ohtsuki, M.; Takizawa, T.; Inaba, H.; Adachi, T. y Kimura, S. 1994b. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 64(4): 316-323.
- Ohta, A.; Osakabe, N.; Yamada, K.; Saito, Y. y Hidaka, H. 1993. Effects of Fructooligosaccharides and Other Saccharides on Ca, Mg and P Absorption in Rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 46(2): 123-129.
- Ohta, A.; Sakai, K.; Takasaki, M.; Uehara, M.; Tokunaga, T. y Adachi, T. 1999. Dietary heme iron does not prevent postgastrectomy anemia but fructooligosaccharides improve bioavailability of heme iron in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69(5): 348-355.
- Ohtsuka, K.; Benno, Y.; Endo, A.; Ueda, H.; Ozawa, O.; Uchida, T. y Mitsuoka, T. 1989. Effects of 4' galactosyllactose on human intestinal microflora. *Bifidus.* 2: 143-149.
- Ohtsuka, K.; Tsuji, K.; Nakagawa, Y.; Ueda, H.; Ozawa, O.; Uchida, T. y Ichikawa, T. 1990. Availability of 4' galactosyllactose (O-beta-D-galactopyranosyl-(1-4)-O-beta-D-galactopyranosyl-(1-4)-D-glucopyranose) in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 36: 265-276.
- Orrhage, K. y Nord, C.E. 1999. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr.* 430(Suppl.): 47S-57S.
- Ozawa, O.; Ohtsuka, K. y Uchida, R. 1989. Production of 4' galactosyllactose by mixed cells of *Cryptococcus laurentii* and baker's yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 36: 898-902.
- Pahwa, A. y Mathur, B.N. 1987. Assessment of a bifidus containing infant formula. Part II. Implantation of *Bifidobacterium bifidum*. *Indian J. Dairy Sci.* 40: 364-367.
- Palou A, Serra F. 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud.* 7(3): 76-90.
- Park, Y.K. y Almeida, M.M. 1991. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 331-334.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* 29: 4-8.
- Parrett, A.M. y Edwards, C.A. 1997. *In vitro* fermentation of carbohydrate by breast and formula fed infants. *Arch. Dis. Childhood.* 76: 249-253.
- Parrett, A.M.; Edwards, C.A. y Lokerse, E. 1997. Colonic fermentation capacity *in vitro*: development during weaning in breast-fed infants is slower for complex carbohydrates than for sugars. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 927-933.
- Pedersen, A.; Sandström, B. y Van Amelsvoort, J.M.M. 1997. The effect of ingestion of inulin on blood lipids and gastrointestinal symptoms in healthy females. *Br. J. Nutr.* 78: 215-222.
- Pellier, P.; Flouié, B.; Beaugerie, L.; Franchiseur, F.; Bornet, F. y Rambaud, J.C. 1995. Symptomatic response to varying levels of fructooligosaccharides consumed occasionally or regularly. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49: 501-507.
- Pelto, L.; Isoulari, E.; Lilius, E.M.; Nuutila, J. y Salminen, S. 1998. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy.* 28: 1474-1479.

- Pérez-Llamas, F.; Diepenmaat-Wolters, M.G.E. y Zamora, S. 1996. In vitro bioavailability of iron and zinc: effects of the type, concentration and fractions of digestion products of the protein. *Br. J. Nutr.* 76: 727-741.
- Perrin, S.; Warchol, M.; Grill, J.P. y Schneider, F. 2001. Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *J. Appl. Microbiol.* 90: 859-865.
- Peters, T.J.; Raja, K.B. y Simpson, R.J. 1992. Speciation of trace metals, with special reference to intestinal iron absorption. *Food Chem.* 43: 315-320.
- Petith, M.M.; Wilson, H.D. y Schedl, H. 1979. Vitamin D dependence of *in vivo* calcium transport and mucosal calcium binding protein in rat large intestine. *Gastroenterology.* 76: 99-104.
- Pisacane, A.; Graziano, L.; Mazzarella, G.; Scarpellino, B. y Zona, G. 1992. Breast-feeding and urinary tract infection. *J. Pediatr.* 120: 87-90.
- Pollack, S.; George, J.N.; Rebeca, R.C.; Kaufman, R.M. y Crosby, W.H. 1965. The absorption of non-ferrous metals in iron deficiency. *J. Clin. Invest.* 44: 1470-1473.
- Prentice, A. y Bates, C.J. 1994. Adequacy of dietary mineral supply for human bone and mineralisation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48: 161-177.
- Prieto, J. Gil, A. y Lorente, F. 1987. Fisiopatología del metabolismo calcio-fosfórico. Hipercalcemias. En: *Pregrado de Pediatría 5ª ed.* Luzán de Madrid, España. Pp. 259-266.
- Prosky, L.; Asp, N.G.; Schweizer, T.F.; De Vries, J.W. y Furda, I. 1988. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 1017-1023.
- Raibaud, P. 1999. The bacterial ecosystem of the human intestine. En: *Infectious Pathogens in gastrointestinal and hepatic disorders.* Guglietta, A. y Lirussi, F. (eds.). Barcelona. Prous Science. Pp. 3-13.
- Rasic, J. y Kurmann, J. 1983. Bifidobacteria and their role. *Experientia.* 39(Suppl.): 29S-43S.
- Rasic, J.L. 1983. The role of dairy foods containing bifido and acidophilus bacteria in nutrition and health. *N. Eur. Dairy J.* 4: 80-88.
- Rasic, J.L. y Sad, N. 1990. Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Bull. IDF.* 252: 24-34.
- Rasmussen, H. y Bordier, P. 1974. The physiological and cellular basis of metabolic bone disease. Baltimore, Waverley Press. Pp. 8-104.
- Rathbone, B.J. y Heatley, R.V. 1992. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal disease. Rathbone, B.J. y Heatley, R.V. (eds.). Blackwell scientific publications, Oxford.
- Rechkemmer, G.; Ronnau, K. y Engelhardt, W.V. 1988. Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comp. Biochem. Physiol.* 90: 563-568.
- Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo del 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios *Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE).* N° L 043, 14/02/97. Pp. 1-6. Rectificación del citado Reglamento en DOCE N° L 173, 01/07/97. Pp. 102y DOCE N° L 187, 20/02/99. Pp. 74.
- Rémésy, C. y Demigné, C. 1983. Changes in availability of glucogenic and ketogenic substrates and liver metabolism of fed and starved rats. *Ann. Nutr. Metab.* 27: 57-70.
- Rémésy, C.; Demigné, C. y Moran, C. 1992. Metabolism and utilisation of short-chain fatty acids produced by colonic fermentation. En: *Dietary fiber- a component of food.* Schweizer, T.F. y Edwards, C.A. (eds.). Springer-Verlag. Pp. 137-150.
- Rémésy, C.; Levrat, M.A.; Gamet, L. y Demigné, C. 1993. Caecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *Am. J. Physiol.* 264: 855-862.
- Reuter, G. 1990. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products. *Bifidobacteria Microflora.* 9: 107-118.
- Rivero-Urgell, M. y Santamaria-Orleans, A. 2001. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Develop.* 65(Suppl.): 43S-52S.
- Roberfroid, M. y Slavin, J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(6): 461-480.
- Roberfroid, M.; Gibson, G.R. y Delzenne, N. 1993. Biochemistry of oligofructose, a non-digestible dietary fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutr. Rev.* 51: 137-146.
- Roberfroid, M.B. 1995. A functional food: chicory fructooligosaccharides, a colonic food with prebiotic activity. *World of Ingredients,* March-April, 42.
- Roberfroid, M.B. y Delzenne, N.M. 1998. Dietary fructans. *Ann. Rev. Nutr.* 18: 117-143.
- Roberfroid, M.B.; Bornet, F.; Bouley, C. y Cummings, J.H. 1994. Colonic microflora: Nutrition and health. Summary and conclusions of an ILSI Europe workshop. Barcelona, Spain on 14-16 September.
- Roberfroid, M.B.; Van Loo, J.A.E. y Gibson, G.R. 1998. The bifidogenic nature of chicory

- inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.* 128: 11-19.
- Robert, W.C. y Thomas, H.B. 1983. Iron absorption. *Ann. Rev. Med.* 34: 55-68.
- Rodwell, V.W.; Nordstrom, J.L. y Mitschelen, J.L. 1976. Regulation of HMG CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* 14: 1-74.
- Rolfe RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130(Suppl): 396S-402S.
- Rombeau, J.L. y Kripke, S.A. 1990. Metabolic and intestinal effects of short-chain fatty acids. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 14(Suppl.): 181S-185S.
- Ros, F.M. 1995. Biodisponibilidad mineral en harinas de cereales infantiles enriquecidas con distintas fuentes de hierro. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.
- Rose, S.J. 1984. Bacterial flora of breast-fed infants. *Pediatrics.* 74(4): 563.
- Ross, S. 2000. Functional foods: the food and drug administration perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(Suppl.): 1735S-1687S.
- Rowe, W.A.; Blackmon, D.L. y Montrose, M.H. 1993. Propionate activates multiple ion transport mechanisms in the HT29-18-C1 human colon cell line. *Am. J. Physiol.* 265(3): 564-571.
- Rowland, I. 1988. Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. *Toxicol. Pathol.* 16: 147-153.
- Rowland, I.R. y Tanaka, R. 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 667-674.
- Roy, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 167-182.
- Roy, D.; Mainville, I. y Mondou, F. 1997. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *Int. Dairy J.* 7: 785-793.
- Rude, R.K. 1996. Magnesium homeostasis. En: *Principle of bone biology.* Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G. y Rodan, G.A. (eds.). Academic Press, San Diego, California. Pp. 277-293.
- Rudloff, S.; Pohlentz, G.; Diekmann, L.; Egge, H. y Kunz, C. 1996. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr.* 85(5): 598-603.
- Rumessen, J.J.; Bode, S.; Hamberg, O. y Hoyer, E.G. 1990. Fructans of Jerusalem artichokes: intestinal transport, absorption, fermentation and influence on blood glucose, insulin and C-peptide responses in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 675-681.
- Rumney, C.J. y Rowland, I.R. 1992. *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34: 299-311.
- Ruppin, H.; Bar Meir, S.; Soergel, K.H.; Wood, C.M. y Schmitt, M.G. 1980. Absorption of short chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology.* 78: 1500-1507.
- Rycroft, C.E.; Fooks, L.J. y Gibson, G.R. 1999. Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2(6): 481-484.
- Rycroft, C.E.; Jones, M.R.; Gibson, G.R. y Rastall, R.A. 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91: 878-887.
- Saavadra, J.M.; Bauman, N.A.; Oung, I.; Pernan, J.A. y Yolken, R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 344: 1046-1049.
- Saavedra, J. 2000. Probiotics and infectious diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* 95(Suppl.): 16S-18S.
- Sabharwal, H.; Sjoblad, S. y Lundblad, A. 1991. Affinity chromatographic identification and quantification of blood group A-active oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 12: 474-479.
- Sahota, S.S.; Bramley, P.M. y Menzies, I.S. 1982. The fermentation of lactulose by colonic bacteria. *J. General Microbiol.* 128: 319-325.
- Sakai, K.; Aramaki, K.; Takasaki, M.; Inaba, H.; Tokunaga, T. y Ohta, A. 2001. Effect of dietary short-chain fructooligosaccharides on the cecal microflora in gastrectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(2): 264-269.
- Sakai, K.; Ohta, A.; Shiga, K.; Takasaki, M.; Tokunaga, T. y Hara, H. 2000. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *J. Nutr.* 130(6): 1608-1612.
- Sakata, T. 1987. Stimulatory effect of short chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: A possible explanation for the trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic effects. *Br. J. Nutr.* 58: 95-103.
- Sakata, T. y Engelhardt, W. Von. 1983. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on the epithelial cell proliferation in rat large intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 74A: 459-462.
- Sako, T., Matsumoto K, Tanaka R. 1999. Recent progress on research and applications of

- non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 9: 69-80.
- Salminen, S. 1996. Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutr. News Lett.* 5: 16-18.
- Salminen, S.; Bouley, C.; Bouton-Ruault, M.C.; Cummings, J.H.; Franck, A.; Gibson, G.R.; Isolauri, E.; Moreau, M.C.; Roberfroid, M. y Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80(Suppl.): 147S-171S.
- Salminen, S.; Deighton, M. y Gorbach, S. 1993. Lactic acid bacteria on health and disease. En: *Lactic acid bacteria*. Salminen, S. y Wright, A. (eds.). New York, Marcel Dekker Inc. Pp. 357-428.
- Salminen, S.; Isolauri, E. y Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70: 251-262.
- Samona, A. y Robinson, R.K. 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.* 44: 64-66.
- Sánchez Valverde, F. y Olivera, J.E. 1990. Alimentación complementaria: revisión histórica. *Actualidad Nutricional.* 3: 5-9.
- Sanders, M.E. 1993a. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic acid cultures: significance of fluid milk products containing cultures. *J. Dairy Sci.* 76: 1819-1828.
- Sanders, M.E. 1993b. Effects of consumption of lactic cultures on human health. En: *Advances in food and nutrition research*. San Diego, Academic Press. Pp. 357-428.
- Sanders, M.E. 1998a. Development of consumer probiotics for the U.S. market. *Br. J. Nutr.* 80(Suppl.2): 213S-218S.
- Sanders, M.E.; Walker, D.C.; Walker, K.M.; Aoyama, K. y Klaenhammer, T.R. 1996. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Science.* 79: 943-955.
- Sanders, W.E. y Sanders, C.C. 1984. Modification of normal flora by antibiotics: Effects on individuals and the environment. En: *New dimensions in antimicrobial therapy*. Roote, R.K y Sande, M.A. (eds.). New York, Churchill Livingstone. Pp. 217-241.
- Sarriá, B. y Vaquero, M.P. 2001. Zinc and iron bioavailability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats. *J. Nutr.* 12: 266-273.
- Sarriá, B.; López-Fandiño, R. y Vaquero, M.P. 2000. Protein nutritive utilization in rats fed powder and liquid infant formulas. *Food Sci. Technol. Int.* 6(1): 9-17.
- Sarriá, B.; López-Fandiño, R. y Vaquero, P. 2001. Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability?. *Nutrition.* 17: 326-331.
- Sarriá-Ruiz, B. 1998. Efectos del tratamiento térmico de fórmulas infantiles y leche de vaca sobre la biodisponibilidad mineral y proteica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- Scardovi V. 1986. Irregular nonsporulating gram positive rods. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. Pp. 1418-1434.
- Scardovi, V. y Trovattelli, L.D. 1965. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.* 15: 19-29.
- Schaafsma, G. 1996. State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr. News Lett.* 5: 23-24.
- Schaafsma, G. y Visser, R. 1980. Nutritional interrelationships between calcium, phosphorus and lactose in rats. *J. Nutr.* 110: 1101-1111.
- Scharrer, E. y Lutz, T. 1990. Effects of short chain fatty acids and K on absorption of Mg and other cations by the colon and cecum. *Ernährungswiss.* 29: 162-168.
- Scharrer, E. y Lutz, T. 1992. Relationship between volatile fatty acids and magnesium absorption in mono- and polygastric species. *Magnesium Res.* 5: 53-60.
- Scheppach, W.; Bartram, P.; Richter, A.; Liepord, H.; Dusel, G.; Hofstetter, G.; Rütthlein, J. y Kasper, H. 1992. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa *in vitro*. *J. Parent. Enteral. Nutr.* 16: 43-48.
- Schneeman, B.O. 1999. Fiber, inulin and oligofructose, similarities and differences. *J. Nutr.* 129(Suppl.): 1424S-1427S.
- Scholz-Ahrens, K.E. y Schrezenmeir, J. 2002. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *Br. J. Nutr.* 88(4): 365-377.
- Scholz-Ahrens, K.E.; Schaafsma, G.; van den Heuvel, E.G.H.M. y Schrezenmeir, J. 2001b. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl.): 459S-464S.
- Scholz-Ahrens, K.E.; van Loo, J. y Schrezenmeir, J. 2001a. Effect of oligofructose on bone mineralization in ovariectomized rats is affected by dietary calcium. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl.): 498S.
- Schönfeld, H. 1926. Ubre die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jahrb Kinderheilkd.* 113: 19-60.

- Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr. (Suppl.2)*: 361S-364S.
- Schulz, A.G.M.; Van Amelsvoort, J.M.M. y Beynen, A.C. 1993. Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats. *J. Nutr.* 123: 1724-1731.
- Schumann, W.C.; Magnusson, I.; Chandramouli, V.; Rumarán, K.; Wahren, J. y Landan, B.R. 1991. Metabolism of (2-<sup>14</sup>C) acetate and its use in assessing hepatic Krebs cycle activity and gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 266: 6985-6990.
- Sebald, M.; Gasser, F. y Werner, H. 1965. DNA base composition and classification. Application to group of bifidobacteria and to related genera. *Ann. Inst. Pasteur.* 109: 251-269.
- Seeling, M.S. 1964. The requirement of magnesium deficiency in man. *Ann. N.Y. Acad.* 162: 847-855.
- Sekine, K.; Toida, T.; Saito, M.; Kuboyama, M. y Kawashima, T. 1985. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.* 45: 1300-1307.
- Sellin, J.H.; Meredith, S.C.; Kelly, S.; Schneir, H. y Rosenberg, I.H. 1984. Prospective evaluation of metabolic bone disease after jejunoileal bypass. *Gastroenterology.* 87: 123-129.
- Sepp, E.; Mikelsaar, M. y Salminen, S. 1993. Effect of administration of *Lactobacillus casei* strain GG on the gastrointestinal microbiota of newborns. *Microb. Ecol. Health Dis.* 6: 309-314.
- Sgorbati, B.; Biavati, B. y Palenzona, D. 1995. The genus *Bifidobacterium*. En: *The lactic acid bacteria*, vol. 2. The genera of lactic acid bacteria. Chapter 8. B.J.B. Wood y W.H. Holzapel (eds.). Blackie Academic, London. Pp. 279-306.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83: 894-907.
- Shah, N.P. y Jelen, P. 1990. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J. Food Sci.* 55: 506-509.
- Shah, N.P.; Lankauthra, M.L.; Britz, M.L. y Kyle, W.S. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage. *Int. Dairy J.* 5: 515-521.
- Sherman, A.R.; Helyar, L. y Wolinsky, I. 1985. Effects of dietary protein concentration on trace minerals in rat tissues at different ages. *J. Nutr.* 115: 607-609.
- Shils, M.E. 1988. Magnesium in health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 8: 429-460.
- Shimamura, S. 1989. Effect positif de la lectoferrine sur la croissance du *Bifidobacterium*. En: *Bifidobacterium et facteurs bifidogènes. Rôle en santé humaine.* ARBBA.
- Shimamura, S.; Abe, F.; Ishibashi, N.; Miyakawa, H.; Yaeshima, T.; Araya, T. y Tomita, M. 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.* 75: 3296-3306.
- Shimamura, S.; Abe, F.; Ishibashi, N.; Miyakawa, H.; Yaeshima, T. y Tomita, M. 1990. Endogenous oxygen uptake and polysaccharide accumulation in *Bifidobacterium*. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2869-2874.
- Shin, H.S.; Jong-Hwa, L.; Pestka, J. y Ustunol, Z. 2000b. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *J. Food Prot.* 63: 327-331.
- Shin, H.S.; Lee, J.H.; Pestka, J.J. y Ustunol, Z. 2000a. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *J. Food Sci.* 65(5): 884-887.
- Siigur, U.; Ormisson, A. y Tamm, A. 1993. Faecal short-chain fatty acids in breast-fed and bottle-fed infants. *Acta Paediatr.* 82: 536-538.
- Siimes, M.A. y Dallman, P.R. 1974. New kinetic role for serum ferritin in iron metabolism. *Br J Haematol.* 1974 28(1): 7-18.
- Silvi, S.; Rumney, C.J. y Rowland, I.R. 1996. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 561-564.
- Simhon, A.; Douglas, J.R.; Drasar, B.S. y Soothill, J.F. 1982. Effect of feeding on infant's faecal flora. *Arch. Dis. Chil.* 57: 54-58.
- Skyberg, D.; Stromme, J.H.; Nesbakken, R. y Harnaes, K. 1968. Neonatal hypomagnesemia with selective malabsorption of magnesium—a clinical entity. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: 355-358.
- Smart, J.B. 1993. Transferase reactions of  $\beta$ -galactosidases—new product opportunities. *Bull. Int. Dairy Fed.* 289: 16-22.
- Smith, R. 1993. Bone mineral. En: *Human nutrition and dietetics.* Garrow, J.S. y James, W.P.T. (eds.). Edinburgh: Churchill Livingstone. Pp. 162-173.
- Sozzi, T.; Brigidi, P.; Mignot, O. Y Matteuzzi, D. 1990. Use of dicloxacillin for the isolation and counting of *Bifidobacterium* from dairy products. *Lait.* 70: 357-361.
- Spencer, H.; Kramer, L.; Osis, D. y Norris, C. 1978. Effect of phosphorus on the

- absorption of calcium and on the balance in man. *J. Nutr.* 108: 447-457.
- Spiegel, J.E.; Tose, R.; Karabell, P.; Frankos, V.H. y Schmitt, D.F. 1994. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.* 48(1): 85-89.
- Spik, G.; Brunet, C.; Mazurier-Dehaine, C.; Fontaine, G. y Montreuil, J. 1982. Characterization and properties of human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants. *Acta Paediatr. Scand.* 71: 979-985.
- Splett, P.L. y Story, M. 1991. Child nutrition: objectives for the decade. *J. Am. Diet. Ass.* 91: 665-668.
- Standing Committee on Nutrition of the British Paediatric Association. 1994. Is breastfeeding beneficial in the U.K.?. *Br. J. Nutr.* 20: 363-372.
- Stark, P.L. y Lee, A. 1982. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* 15: 189-203.
- Stevenson, D.K.; Yang, C.; Kerner, J.A. y Yeager, A.S. 1985. Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula. *Clin. Pediatr.* 24(6): 338-341.
- Stone-Dorshow, T. y Levitt, M.D. 1986. Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructooligosaccharide sweetener. *Food Chem.* 22: 46-61.
- Sultan, H.Y. y Barker, D.J.P. 1994. Programming the baby. En: *Mothers, babies and disease in later life.* Barker, D.J.P. (ed.). London. Br. Med. J. Publishing Group. Pp. 14-36.
- Summanen, P.; Baron, E.J.; Citron, D.M.; Strong, C.A.; Wexler, H.M. y Finegold, S.M. 1993. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual.* 5<sup>th</sup> ed. Star Publishing Company, Belmont, Calif, USA. Pp. 230.
- Tahri, K.; Crociani, J.; Ballongue, J. y Schneider, F. 1995. Effect of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Letters Appl. Microbiol.* 21: 149-151.
- Tahri, K.; Grill, J.P. y Schneider, F. 1997. Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Current Microbiol.* 34: 79-84.
- Tamai, S.; Ohtsuka, K.; Ozawa, O. y Uchida, T. 1992. Effect of a small amount of galactooligosaccharides on fecal *Bifidobacterium*. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 45: 456-460.
- Tamime, A.Y.; Marshall, V.M.E. y Robinson, R.K. 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* 62: 151-187.
- Tanaka, R.; Takayama, H.; Morotomi, M., Kuroshima, T.; Ueyama, S.; Matsumoto, K.; Kurosa, A. y Mutai, M. 1983. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora.* 2(1): 17-24.
- Tanaka, Y.; Bush, K.; Eguchi, T.; Ikekawa, N.; Takaguchi, T.; Kobayashi, Y. y Higgings, P.J. 1990. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues on butyrate-induced differentiated phenotype. *Arch. Biochem. Biophys.* 276: 415-423.
- Tannock, G.W. 1994. The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract. En: *Human health: the contribution of microorganisms.* Gibson, S.A.W. (ed.). London, Springer-Verlag. Pp. 1-16.
- Tannock, G.W. 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol.* 15: 270-274.
- Tannock, G.W.; Fuller, R.; Smith, S.L. y Hall, M.A. 1990. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1225-1228.
- Tashiro, Y.; Satchithanadam, S. y Calvert, R.J. 1997. Gastrointestinal effects of fructooligosaccharides. En: *Dietary fiber in health and disease.* Kritchevsky y Bonfield (eds.). Plenum Press, New York. Pp. 221-234.
- Terada, A.; Hara, H.; Kataoka, M. y Mitsuoka, T. 1992. Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human fecal flora. *Microb. Ecol. Health Dis.* 5: 43-50.
- Teraguchi, S.; Uehara, M.; Ogasa, K. y Mitsuoka, T. 1978. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Jpn. J. Bact.* 33: 753-761.
- Tissier, H. 1900. *Rechercher sur la flore intestinale des nourissons (etat normal et pathologique).* Thèse de médecine de l'Université de Paris.
- Tochikura, T.; Sakai, K.; Fujiyoshi, T.; Tachiki, T. y Kumagai, H. 1986. *P-Nitrophenyl glycoside-hydrolyzing activities in bifidobacteria and characterization of β-D-galactosidase of Bifidobacterium longum.* *Agric. Biol. Chem.* 50: 2279-2286.
- Tojo, R., Leis, R., Oavón, P. y col. 1995. Leche humana y fórmulas infantiles: comparación nutricional. En: *Nuevas perspectivas en nutrición infantil.* Bermejo, E., López, M., Morán (eds.). Madrid: Ergón. Pp. 23-28.
- Tojo, R., Pavon, P., Couce, M.L. y Antelo, J. 1987a. Calendario de alimentación: Interrelación entre necesidades nutricionales y el desarrollo y maduración psicomotora, intestinal y renal. En

- problemas de atención y prevención primaria en pediatría. Eds. Pombo, M. Y & Martínón, J.J. III Reunión de las Sociedades de Pediatría de Portugal, Asturias, Cantabria, Castilla-León. Santiago de Compostela, España.
- Tokunaga, T.; Nakada, Y.; Tashiro, Y.; Hirayama, T. y Hidaka, H. 1990. Effects of fructooligosaccharides intake on the intestinal microflora and defecation in healthy volunteers. *Bifidus*. 6: 143-150.
- Tokunaga, T.; Oku, T. y Hosoya, N. 1986. Influence of chronic intake of a new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 32: 111-121.
- Tokunaga, T.; Oku, T. y Hosoya, N. 1989. Utilization and excretion of a new sweetener, fructooligosaccharides, in rats. *J. Nutr.* 119: 553-559.
- Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.* 48: 61-65.
- Trautwein, EA.; Rieckhoff, D. y Erbersdobler, H.F. 1998. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters. *J. Nutr.* 128: 1937-1943.
- Trinidad, P.T.; Wolever, T.M.S. y Thompson, L.U. 1993. Interactive effects of calcium and short chain fatty acids on absorption in distal colon of man. *Nutr. Res.* 13: 417-425.
- Tsuji, Y.; Yamada, K.; Hosoya, N. y Moriuchi, S. 1986. Digestion and absorption of sugars and sugars substitutes in rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 32: 93-100.
- Tuomola, E.M. y Salminen, S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food. Microbiol.* 41: 45-51.
- Turton, L.J.; Drucker, D.B. y Ganguli, L.A. 1983. Effect of glucose concentration in the growth medium upon neutral and acidic fermentation end-products of *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sporogenes* and *Peptostreptococcus anaerobius*. *Med. Microbiol.* 16: 61-67.
- Udall, J.N. Jr. y Kilbourne, K.A. 1988. Selected aspects of infant feeding. *Nutrition*. 4: 409-415.
- USDA (United States Department of Agriculture). 1987. Nationwide Food Consumption Survey. Continuing Survey of Food Intakes by Individuals: Women 19-50 Years and their Children 1-5 Years, 4 Days, 1985. Report 85-4. Nutrition Monitoring Division, Human Nutrition Information Service. U.S. Department of Agriculture. Hyattsville, USA. Pp. 182.
- Ustunol, Z. y Gandhi, H. 2001. Growth and viability of comercial *Bifidobacterium* spp. In honey-sweetened skim milk. *J. Food Prot.* 64(11): 1775-1779.
- Valette, P.; Pelenc, V.; Djouzi, Z.; Andrieux, C.; Paul, F.; Monsan, P. y Szyliet, O. 1993. Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J. Sci. Food. Agri.* 62: 121-127.
- Van Biervliet, J.P.; Vinaimont, N. y Rosseneu, M. 1992. Serum cholesterol, cholesterol ester, and high density lipoprotein development in newborn infants: Response to formulas supplemented with cholesterol and gamma-linolenic acid. *J. Pediatr.* 120: 2101-2108.
- van Campen, D.R. y Gross, E. 1969. Effect of histidine and certain amino acids on the absorption of iron<sup>59</sup> by rats. *J. Nutr.* 99: 68-74.
- van den Heuvel, E.G.H.M.; Muys, T.; van Dokkum, W. y Schaafsma, G. 1999a. Lactulose stimulates calcium absorption in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 7: 1211-1216.
- van den Heuvel, E.G.H.M.; Muys, T.; van Dokkum, W. y Schaafsma, G. 1999b. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 544-548.
- van den Heuvel, E.G.H.M.; Schaafsma, G.; Muys, T. y van Dokkum, W. 1998. Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and nonheme-iron absorption in young healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 445-451.
- van Dokkum, W.; van den Heuvel, E.G.H.M.; Havenaar, R.; Srikumar, T.S.; van Aken, P. y Wezendonk, B. 1995. The effect of non digestible oligosaccharides (NDO) on human physiology. Report TNO. Zeist. The Netherlands.
- Van Loo, J.; Coussement, P.; De Leenheer, L.; Hoebregs, H. y Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diets. *Crit. Rev. Food Sci. Technol.* 35(6): 525-552.
- van Munster, I.P.; Tangerman, A. y Nagengast, F.M. 1994. The effect of resistant starch on colonic fermentation, bile acid metabolism and mucosal proliferation. *Dig. Dis. Sci.* 39: 834-842.
- Vandenplas, Y. 2002. Oligosaccharides in infant formula. *Br. J. Nutr.* 87(Suppl.): 293S-296S.
- Vanderhoof, J.A.; Young, R.J.; Murray, N. y Kaufman, S.S. 1998. Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27: 155-160.
- Venketeshwer Rao, A.; Shiwnarain, N.; Koo, M. y Jenkins, D.J.A. 1994. Effect of fiber-rich foods on the composition of intestinal microflora. *Nutr. Res.* 14: 523-535.

- Villa Elizaga, I.; Navarro Blasco, I. y Marth Pérez, A. 1999. Capítulo 14. Elementos traza. En: Tratado de Nutrición. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. Pp. 229-247.
- Viverge, D.; Grimmonprez, L.; Cassanas, G.; Barder, L.; Bonnet, H. y Solere, M. 1985. Variations of lactose and oligosaccharides in milk from women of blood types secretor A or H, secretor Lewis and secretor H/non secretor Lewis during the course of lactation. *Ann. Nutr. Metab.* 29: 1-11.
- Volpe, J.J. 1987. Neuronal proliferation, migration, organization, and myelination. En: *Neurology of the newborn*, 2<sup>nd</sup> edn. Saunders. Philadelphia, USA. Pp. 33-68.
- Voragen, A.G.J. 1998. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends Food Sci. Technol.* 9: 328-335.
- Walch, E. 1956. Effect of derivates of N-acetylglucosamine on the intestinal flora of infants. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 81: 661-664.
- Walter, T.; de Andraca, I.; Chadud, P. y Perales, C.G. 1989. Iron deficiency anemia: adverse effects on infant psychomotor development. *Pediatrics.* 84: 7-17.
- Wang, R.F.; Cao, W.W. y Cerniglia, C.E. 1996. PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 164-171.
- Wang, X. 1993. Comparative aspects of carbohydrate fermentation by colonic bacteria. Ph.D. thesis, University of Cambridge, U.K.
- Wang, X. y Gibson, G.R. 1993. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 373-380.
- Wasserman, R.H. y Lengemann, F.W. 1960. Further observations on lactose stimulation of the gastrointestinal absorption of calcium and strontium in the rat. *J. Nutr.* 70: 377-384.
- Weaver, C.M. 2000. The growing years and prevention of osteoporosis in later life. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 303-306.
- Wecver, L. 1991. Anatomy and embriology. En: *Pediatric gastrointestinal disease*. Vol. I. Walker y col. (eds.). Philadelphia: BC Decker. Pp. 195-216.
- West, P.A.; Hewitt, J.H. y Murphy, O.M. 1979. The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 269-277.
- Wester, P.O. 1989. Magnesium. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1305-1312.
- William, P.; Robinson, . y Baily, A. 1979. High density lipoprotein and coronary risk factor. *Lancet.* 1: 72.
- Williams C.L., Bollella M., Ernst L. y Wynder M.D. 1995. A new recommendation for dietary fibre in childhood. *Paediatrics.* 96: 985-988.
- Williams, C.M. 1999. Effects of inulin on lipid parameters in humans. *J. Nutr.* 129(Suppl.7): 1471S-1473S.
- Willis, A.T.; Bullen, C.L.; Williams, K.; Fagg, C.G.; Bourne, A. y Vignon, M. 1973. Breast milk substitute: a bacteriological study. *Br. Med. J.* 4: 67-72.
- Wilson, K. y Blitchington, R.B. 1996. Human colonic bacteria studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2273-2278.
- Wolever, T.M.S.; Spadafora, P. y Eshuis, H. 1991. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 681-687.
- Wolin, M.J. y Miller, T.L. 1983. Carbohydrate fermentation. En: *Human intestinal flora in health and disease*. Hentges, D.A. (ed.). Academic Press, New York. Pp. 147-165.
- Wong, N.P. y LaCroix, D.E. 1980. Biological availability of calcium in dairy products. *Nutr. Rep. Int.* 21: 673-680.
- Yaguchi, H. 1984. The progress of milk products containing viable bifidobacteria. *Jpn. J. Dairy Food Sci.* 33: A203-A212.
- Yamaguchi, F.; Shimizu, N. y Hatanaka, C. 1994. Preparation and physiological effect of low-molecular-weight pectin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 679.
- Yamashita, K. y Kobata, A. 1974. Oligosaccharides of human milk. V. Isolation and characterization of anew trisaccharide, 6'-galactosyllactose. *Arch. Biochem. Biophysics.* 161: 164-170.
- Yamashita, K.; Kawai, K. y Itakura, K. 1984. Effect of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr. Res.* 4: 961-966.
- Yazawa, K. y Tamura, Z. 1982. Search for sugar sources for selective increase of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora.* 1: 39-44.
- Yazawa, K.; Imai, K. Y Tamura, Z. 1978. Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilisable by bifidobacteria. *Chem. Pharm. Bull.* 26: 3306-3311.
- Yip, R. y Dallman, P.R. 1988. The roles of inflamation and iron deficiency as causes of anemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 86-118.
- Yoshioka, H.; Fujita, K.; Sakata, H.; Murono, K. y Iseki, K. 1991. Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infant and children. *Bifidobacteria Microflora* 10: 11-17.
- Yoshioka, H.; Iseki, K. y Fujita, K. 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics.* 72: 317-321.

- Younes, H., Demigné, C. and Rémésy, C. 1996. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *B. J. Nutr.* 75:301-314.
- Younes, H.; Levrat, M.A.; Demigné, C. y Rémésy, C. 1993. Relationship between fermentations and calcium in the cecum of rats fed digestible or resistant starch. *Ann. Nutr. Metab.* 37: 311-319.
- Younes, H.; Rémésy, C.; Behr, S. y Demigné, C. 1997. Fermentable carbohydrate exerts a urea lowering effect in normal and nephrectomised rats. *Am. J. Physiol.* 272(3 Pt.1): 515-521.
- Yuhara, T.; Isojima, S.; Tsuchiya, F. y Mitsuoka, T. 1983. On the intestinal flora of bottle-fed infant. *Bifidobacteria Microflora.* 2(1): 33-39.
- Yun, J.W. 1996. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microbial. Tech.* 19: 107-117.
- Zopf, D. y Roth, S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet.* 347: 1017-1021.



Faculty of Veterinary

**UNIVERSITY OF MURCIA**

**DOCTORAL THESIS**

**ADDITION OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS TO  
INFANT FORMULAS AND THEIR EFFECT ON MINERAL  
BIOAVAILABILITY**

Darío Pérez Conesa  
Department of Food Science and Nutrition  
Murcia 2003

## **INTRODUCTION**

There are very good reasons to study nutrition and growth during infancy, since this is the period of life when the speed of growth and nutritional requirements are the highest. Children increase their weight in three-fold and their length about 50% during the first year. In fact, this process becomes more evident during the first month of life, when growth is specially fast, since infants acquire 200 g of weight and increase their length in 1 cm per week. In a parallel way, organs grow and mature at high proportion. Animal studies have shown that differences in the diet during early age may have metabolic consequences at later age (Sultan and Barker, 1994), specially on subject growth up, and afterwards it could produce diseases (Lucas et al., 1990).

Breast-feeding has a very special role in infants feeding and from a quality point of view it is considered higher than bottled-feeding (Standing Committee on Nutrition of the British Paediatric Association, 1994). Natural feeding is since a nutritional point of view the most important during the first months of infancy. However, and although two third parts of the healthy infants from all over the world are initially breast-fed, this amount is considerably reduced during lactation. Consequently, a big population of healthy infants is fed with artificial lactation by using commercial infant formulas. This situation makes important the challenge of providing the nutrients and bioactive factors that stimulate the development of a microbiota which promotes gastrointestinal health. This challenge becomes higher when critical cares are considered, such as pre-term infants and infants with parenteral feeding. Clearly, infant nutrition supplies a very practical and important reason for understanding the ecology development of the infant intestine (Gaskins and Lien, 1999).

Although nowadays breast-feeding is considered as the natural and preferable method for infant feeding, it was not always considered in this way. In 1500 aristocrat women from England thought that nursing a baby was inconvenient and made the mothers old prematurely. Therefore, it was established that breast-feeding should be done by substitute mothers. High class women from any part of the world often had from 12 to 20 children, even 30 was not unusual, and wet-nursing was the only safe and responsible option (Udall and Kilbourne, 1988).

Modern technology introduced a change in infant feeding: cow milk based formula. The development of this formula was promoted by the discovery of milk pasteurization and the digestibility improvement of cow milk after heat treatment. The first cow milk based formula was traded in 1867 by the German chemist Von Liebig. The commercial success of this formula generated a substitute product of human milk between the end of XIX century and the beginning of XX century. Generally this formula could be divided into three types: dried cow milk combined with a sugared cereal, any kind of malted carbohydrate, and cereals with fresh cow milk (Anderson et al., 1982). Due to that, infant nutritional requirements were estimated during the next decades, the nutritional value of the improved "humanised formula" and the composition of the formula started to mimic the human milk composition.

The production and distribution of the infant formula has been transformed in a complex purpose during the XX century. This fact involves the knowledge of the nutritional requirements, digestion physiology and nutrients absorption, and the technology for the production of formulas, the economy to produce healthy and nutritive infant formula at a reasonable price. Nowadays it is known that diet, among other environmental and genetic factors, has an important role in health and disease status of the subject. There is also an increasing evidence that human colon microbiota could affect positively on nutrition and health of the host. Therefore, the capacity to modulate the diet has been proposed as an important factor to improve the health of the human intestine, especially during infancy which is the most sensitive period of life (Mountzouris et al., 2002).

Many authors have shown the existence of differences in the intestine microflora composition and in the incidence of infections between breast-fed and bottled-fed infants. Although the development of infant formulas has shown an important increase since the beginning of its trading, there are some components of the human milk that can not be duplicated in the infant formula and could be the reason for these differences. However, there are several functional ingredients such as oligosaccharides, prebiotics and probiotics that could be added to the infant formula and modify beneficially the composition and activities of the microflora of infants (Gibson and Roberfroid, 1995).

## **OBJECTIVES**

The aims of the present thesis were:

- 1.- To evaluate the in vitro growth of some species of bifidobacteria with different non-digestible oligosaccharides as substrates, and select the most suitable for its use as a prebiotic in infant formulas.
- 2.- To study the viability of the bifidobacteria incorporated in a probiotic infant formula during its period of consumption.
- 3.- To evaluate the effect of the consumption of a probiotic infant formula on the infant faecal flora during the first year of life.
- 4.- To know the effect of the administration of seven diets formed by infant formulas supplemented with bifidobacteria and/or galactooligosaccharides on in vivo bioavailability of calcium, magnesium, phosphorous and iron, in weaning Sprague-Dawley rats using a mineral balance.
- 5.- To determine the influence of probiotics and prebiotics added to infant formulas on the intestinal epithelium of the cecum and colon of rats.
- 6.- To determine the influence of probiotics and prebiotics added to infant formulas on the absorption of calcium, magnesium, phosphorous and iron in the cecum and colon of rats.
- 7.- To determine the influence of probiotics and prebiotics added to infant formulas on the deposition of calcium, magnesium, phosphorous and iron in the femur and tibia of rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Experimental schedule**

The work of the current Thesis was divided in three studies, as it is shown in Figure 1.

In the first study was evaluated the *in vitro* fermentation of different oligosaccharides by the species of *Bifidobacterium* which more often have been isolated in infant faeces. The aim of this study was to select the most suitable substrate to be added to the diet assess in the third study.

In the second study, a commercial infant formula containing the species of bifidobacteria selected in the previous study was used. First, it was evaluated the viability of the bifidobacteria of this infant formula. Following the manufacturer's recommendations, the viability was evaluated during the minimum period of consumption (six days) when children have between 9 months and three years of age and the maximum period of consumption (fourteen days) when children have four months of age. After checking the stability of the bifidobacteria during these periods, it was carried out a study with two groups of infants fed with follow-up infant formula or probiotic follow-up infant formula since the fourth to the twelve month of age. Anaerobe faecal bacteria were enumerated at 1, 3, 5, 7, 9 and 12 months of life to evaluate the effect of the probiotic infant formula on infant faecal flora.

In the third study the effect of probiotics and prebiotics on intestinal mineral absorption and retention was examined in growing male rats using a three periods of three-day mineral balance technique. The OS selected in the first study, was added at different concentrations (1,2, 5 and 10%) to the follow-up infant formula and probiotic follow-up infant formula originating three prebiotics diets and three synbiotic diets. Moreover, the follow-up infant formula was used as control diet and the probiotic follow-up infant formula as probiotic diet. The AO4 maintenance diet for rats was used as a reference diet, and together with the others the nutritional composition of the diets was determined. The mineral balance study also involved a histologist study of the cecal and colonic mucosa, mineral content determination in the solid and liquid phase of the cecal and colonic contents, mineral content determination in femur and tibia, and the faecal bifidobacteria content in rats (Figures 3 and 4) after thirty days of study.

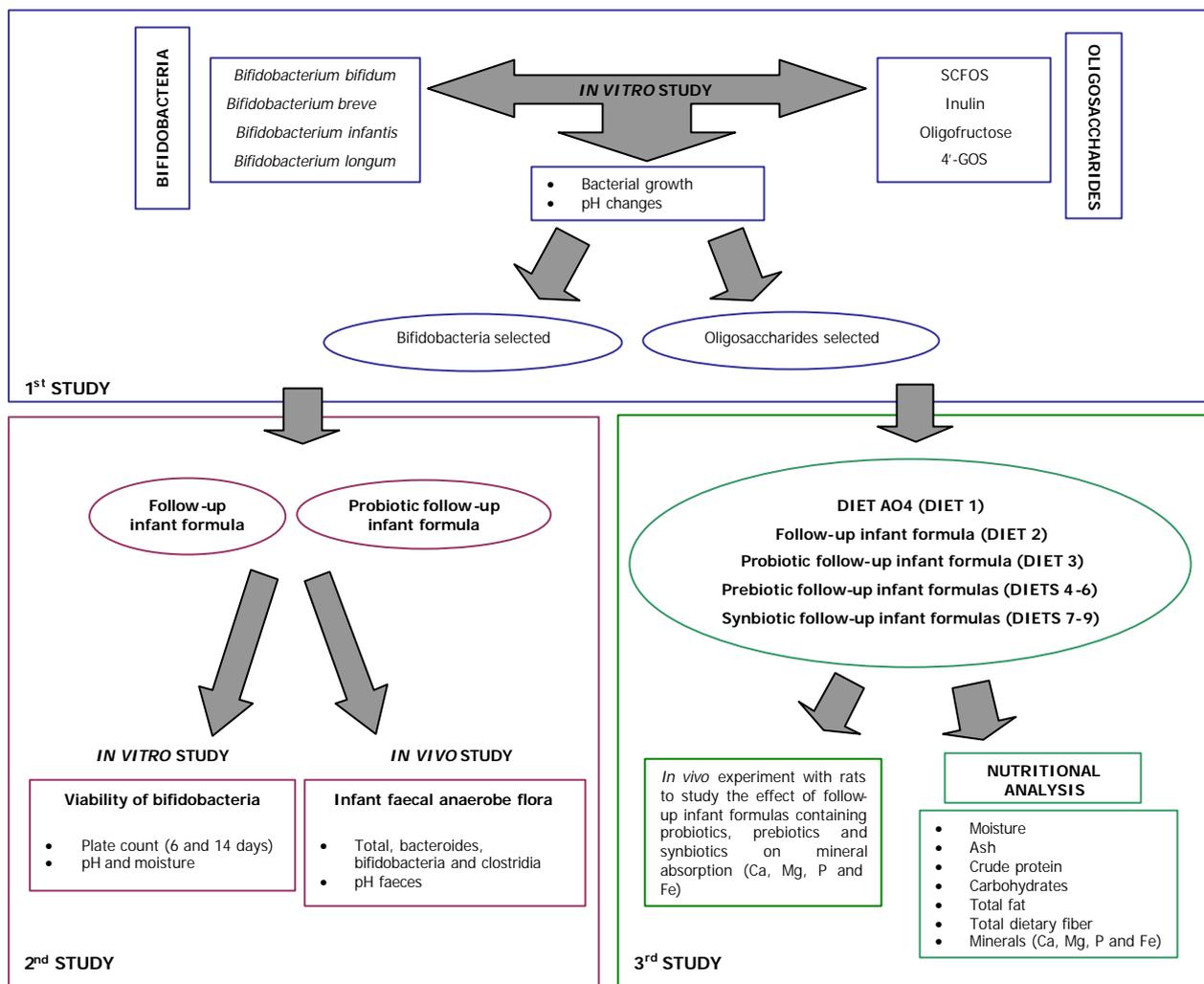


Figure 1. Schematic graph of the experimental design of the study

## 1<sup>st</sup> STUDY

### ***In vitro* evaluation of bifidobacteria growth and pH variation of the culture broth with different non-digestible oligosaccharides (NDO)**

Bifidobacteria used are shown in Table 1. Bacteria cultures were lyophilized and they were maintained refrigerated at 5 °C until their utilization. For bacterial reactivation each culture was rehydrated in TPY (Tryptone Phytone Yeast broth) (Scardovi, 1986) containing (in grams per liter): tryptone, 10,0; soy peptone, 5,0; glucose, 5,0; yeast extract, 2,5; Tween 80, 1,0; cysteine hydrochloride, 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0; Cl<sub>2</sub>Mg·6H<sub>2</sub>O, 0,5; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,25; CaCl<sub>2</sub>, 0,15; pH 7,0, by two consecutive subcultures of 24 hours (Gomez Zavaglia *et al.*, 1998) at 37 °C under anaerobic conditions. Rehydrated culture was inoculated at 5% into TPY broth and was incubated at the same conditions as described before. The culture was then monitored visually every 4 hours after 16 hours of incubation (Dubey and Mistry, 1996) evaluating the turbidity (optical density, OD) of the culture at 600 nm (Gomez Zavaglia *et al.*, 1998; Perrin *et al.*, 2001; Crittenden *et al.*, 2001) in a molecular absorption spectrophotometry (Hitachi U-2000, Japan) to obtain a value of 2 in the MacFarland scale. This measure is equivalent to a absorbance value of 0,615 which it is corresponded to a growth of 6x10<sup>8</sup> cfu/mL. For bacterial cultures was established an equivalence between the turbidity of the seven tubes used as standards (BaCl<sub>2</sub> 1% with increasing volumes of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%) and the bacterial concentration (in cfu/mL) that generates a similar turbidity.

**Table 1.** *Bifidobacterium* used in the first study

| Supplier                                    | <i>Bifidobacterium spp.</i>     |
|---|---------------------------------|
| Spanish type culture collection (STCC)      |                                 |
| STCC 4549                                   | <i>Bifidobacterium bifidum</i>  |
| STCC 4839T                                  | <i>Bifidobacterium breve</i>    |
| STCC 4551T                                  | <i>Bifidobacterium infantis</i> |
| Morinaga nutritional foods Deutschland GmbH |                                 |
| BB536                                       | <i>Bifidobacterium longum</i>   |

Once reached the mentioned concentration (6x10<sup>8</sup> cfu/mL), an aliquot at 1% (vol/vol) of each bifidobacteria was added to screw-capped, sterilized tubes containing TPY broth each one with a different substrate (Table 2) to a concentration of 1,2% (wt/vol). The tubes were incubated at 37 °C anaerobically using AnaeroGen 3,5 L bags (Oxoid, UK) during seven days. Samples were collected aseptically at 0 hours and every 24 hours postinoculation and after shaking in a vortex (Heidolph, Germany) the sample was transferred to a disposable cuvette, and turbidity (culture OD) was measured at 600 nm as previously was described. The bacterial growth was expressed as decimal logarithm of the colony forming units (cfu). Uninoculated sterilized with TPY broth was used as the blank for each substrate.

Another sample was also collected each 24 hours for pH culture measurement with a micro pH 2000 pH-meter (Crison, Barcelona, Spain). Glucose was used as control substrate of the four oligosaccharides and as a reference of the bacterial growth.

To simplify the terminology of the substrates, from now we will name Actilight 950P<sup>®</sup> as short-chain FOS (SCFOS) and in the case of Oligomate 55P<sup>®</sup> as 4'-GOS.

**Table 2.** Substrates used in the first study

| Substrate      | Product                     | Composition  |
|----------------|-----------------------------|--|
| Monosaccharide | Glucose                     | D(+)glucose  |
| FOS*           | Actilight 950P <sup>®</sup> | ‡GF <sub>2</sub> (30,38%), GF <sub>3</sub> (50,18%), GF <sub>4</sub> (15,69%), glucose, fructose and sucrose |
|                | Raftiline HP <sup>®</sup>   | inulin (>99,5%), glucose, fructose and sucrose   |
|                | Raftilose P95 <sup>®</sup>  | oligofructose (>93,2%), glucose, fructose and sucrose  |
| GOS†           | Oligomate 55P <sup>®</sup>  | 4'-galactosyllactose (>55%), lactose and monosaccharides (<45%)  |

\*FOS, fructooligosaccharides; GOS, galactooligosaccharides

‡GF<sub>2</sub>, kestose; GF<sub>3</sub>, nystose; GF<sub>4</sub>, fructosylnystose

## 2<sup>nd</sup> STUDY

### Infant formulas

A powder follow-up infant formula and its probiotic form were provided by the same manufacturer (Hero España S.A.). The consumption of both infant formulas by infants is recommended from the fourth month to the third year of age. The infant formulas have the same ingredients in their composition except the presence of lactic ferments (*Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium longum*) in the probiotic infant formula (see Table 3). The Figure 2 shows the flow diagram of the infant formulas manufacturing process and the step in which the lactic ferments were added.

**Table 3.** Composition of the infant formulas

| Ingredients   | Follow-up infant formula | Probiotic follow-up infant formula |
|---|--------------------------|------------------------------------|
| Skim milk   | +                        | +                                  |
| Demineralized whey-protein                                | +                        | +                                  |
| Dextrinomaltose   | +                        | +                                  |
| Vegetal oils  | +                        | +                                  |
| Lactose   | +                        | +                                  |
| Lecitin   | +                        | +                                  |
| Minerals (added individually)*                            | +                        | +                                  |
| Vitamins (added as a mix)                                 | +                        | +                                  |
| Lactic ferment ( <i>B. bifidum</i> and <i>B. longum</i> ) | -                        | +                                  |
| Taurine   | +                        | +                                  |
| Inositol  | +                        | +                                  |
| Coline  | +                        | +                                  |
| Carnitine   | +                        | +                                  |

\*Mineral content (as mg/100 g): Bisodium phosphate 160 mg; Calcium chloride 320 mg; Calcium citrate 320 mg; Potassium citrate 840 mg; Zinc sulphate 7,7 mg; Copper sulphate 0,96 mg; Iron sulphate 42,88 mg; Potassium iodure 0,04 mg; Magnesium hydroxide 33 mg; Coline chloride 80,4 mg.

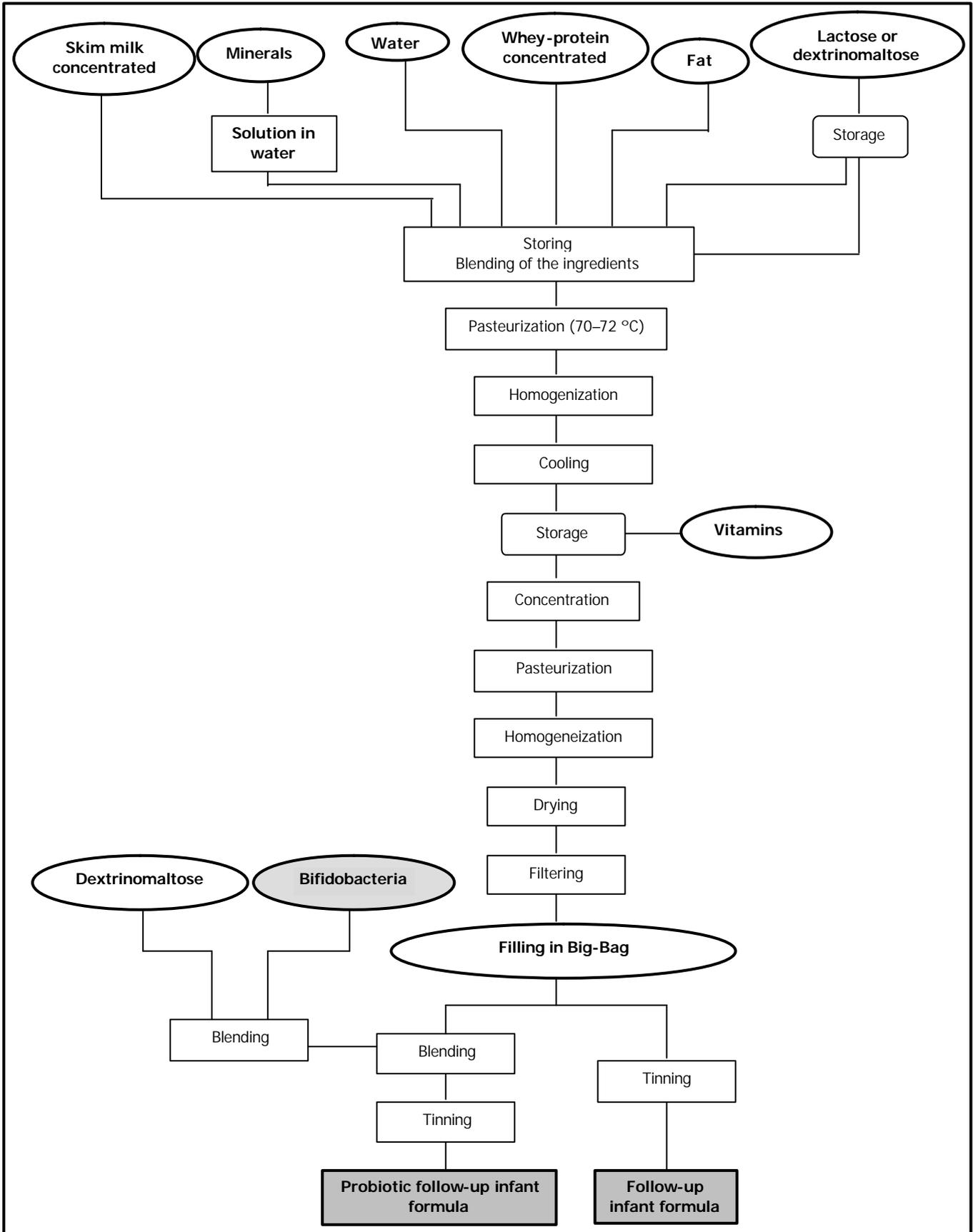


Figure 2. Flow diagram of the infant formulas manufacturing process

## Viability of bifidobacteria in commercial powder infant formula

The viability of the bifidobacteria present in the probiotic follow-up infant formula was determined using as a control the same infant formula without bifidobacteria. To mimic the using conditions of the infant formula by the mother at home, the study was designed according to the rule of consumption described by the manufacturer. It was took into account the number of doses depending the age of the infant, the amount of each dose (4 grams) and each can have approximately 900 g of powdered product. On the basis of these four studies could be designed (Table 4). From all of them, it was carried out the studies with the minimum (six days) and maximum (fourteen days) duration.

From the total amount of formula that should be consumed by the infant, ten grams were suspended in 90 mL of 0,1 M phosphate buffer (pH 7,0) (Macfarlane and Englyst, 1986; Ingham, 1999) and maintained at 22 °C during 30 min until dispersion of the sample. Then, a volume was collected to make the necessary decimal dilutions ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) with peptone water 0,1% (wt/vol), and 1 mL was poured per duplicate on TPY agar with selective supplement containing (in grams per liter): lithium chloride, 3,0; neomycin sulphate, 0,1; nalidixic acid, 0,015 (Moreno *et al.*, 2000). This solution was filter sterilized (0,45  $\mu$ m, Millipore Corporation, Bedford) and added to the autoclaved TPY agar. Another sample from the first dilution was collected to measure the pH of the infant formula during the days of study. The plates were incubated at 37 °C under anaerobic conditions for 72 hours. Moreover, the moisture of the sample was measured, as it is described in the next section, after remove it from the can. The analysis with both follow-up and probiotic follow-up infant formulas were carried out using three cans for each infant formula belonging to the same batch of production.

**Table 4.** Design of the viability of bifidobacteria study for probiotic formula regarding to the guide of consumption recommended by the manufacturer

| Age of the baby                                       | Guide of consumption                        | Duration |
|---|---|----------|
| 4 <sup>th</sup> month                                 | 4 g x 7 doses x 5 daily intakes = 140 g/day | 6 days   |
| 5 <sup>th</sup> –6 <sup>th</sup> month                | 4 g x 8 doses x 4 daily intakes = 128 g/day | 7 days   |
| 7 <sup>th</sup> -9 <sup>th</sup> month                | 4 g x 8 doses x 3 daily intakes = 96 g/day  | 9 days   |
| 9 <sup>th</sup> -10 <sup>th</sup> month and 1-3 years | 4 g x 8 doses x 2 daily intakes = 64 g/day  | 14 days  |

Finally, it was obtained the percentage of the viability of the bifidobacteria using the following calculation (Shin *et al.*, 2000a):

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{cfu } t_1}{\text{cfu } t_0} \times 100$$

where  $t_0$  is the first day of the study, and  $t_1$  is the last day of the study.

## Composition of faecal microflora in infants fed control or probiotic formula during the first year of life

This study was carried out to evaluate if the composition of the infant faecal microflora was affected by the consumption of the probiotic follow-up infant formula (containing *Bifidobacterium* spp.) during the first year of life. Faecal samples were collected at the age of 1, 3, 5, 7, 9 and 12 months from five babies. Two of them were fed with a follow-up infant formula used as control, and the other three were fed with the probiotic follow-up infant formula. Babies were sons/daughters of the members of the Department of Food Science and Nutrition of the University of Murcia. Parents were informed of the study and signed the authorisation of conformist according the Spanish law (15/1999). Samples were collected by the parents in sterile containers and were immediately frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Table 5 shows the feed schedule of infants used in this study.

**Table 5.** Feed schedule of infants participating in the composition of faecal microflora study

| Type of formula    | 1 month | 3 months | 5 months | 7 months | 9 months | 12 months |
|--------------------|---------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Control (baby 1)   | HM      | IF1      | IF2+IC   | IF2+IC+B | IF2+IC+B | IF2+IC+B  |
| Control (baby 2)   | HM+IF1  | IF1+IC   | IF2+IC   | IF2+IC+B | IF2+IC+B | IF2+IC+B  |
| Probiotic (baby 3) | HM+IF1  | IF1      | PIF+IC   | PIF+IC+B | PIF+IC+B | PIF+IC+B  |
| Probiotic (baby 4) | HM+IF1  | HM+IF1   | PIF      | PIF+IC+B | PIF+IC+B | PIF+IC+B  |
| Probiotic (baby 5) | HM      | IF1      | PIF+IC   | PIF+IC+B | PIF+IC+B | PIF+IC+B  |

HM (Human milk), IF1/IF2 (Infant Formula 1 or 2), PIF (Probiotic Infant Formula), IC (Infant Cereals), B (Beikosts: fruit + vegetables + meat + fish)

Faecal pH was determined after 10% faecal suspension in saline solution (0,15 M NaCl solution) with a micro pH 2000 pH-meter (Crison, Barcelona, Spain) after homogenize the suspension in a vortex (Heidolph, Germany) (Langhendries *et al.*, 1995). For the faecal flora composition, 3 g of faecal sample were diluted in 25 mL of peptone water with 0,5% glucose. All the specimens were analysed within 2 hours after being passed to recover the major number of bacteria. Serial 100-fold dilutions were performed in sterile reduced physiological salt solution (RPSS) (physiological solution with 0,5 g/L cysteine HCl, pH 6,7) taking 1 mL of sample and 9 mL of RPW. An aliquot of 0,3 mL was spread on petri dishes (see conditions in Table 6). All the analysis were carried out under strict anaerobic conditions using an atmosphere composed by 80%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$ , 10%  $\text{H}_2$ , and the plates were incubated in anaerobic jars.

**Table 6.** Culture conditions of bacteria in the composition of infant faecal microflora

| Bacteria               | Culture media* | Dilutions              | Temp. and time of incubation | References                        |
|------------------------|----------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Total anaerobes</b> | CBA            | $10^{-4}$ to $10^{-7}$ | 37 $^{\circ}\text{C}$ /48 h  | Langhendries <i>et al.</i> , 1995 |
| <b>Bacteroides</b>     | BBE            | $10^{-4}$ to $10^{-6}$ | 37 $^{\circ}\text{C}$ /48 h  | Summanen <i>et al.</i> , 1993     |
| <b>Bifidobacterium</b> | RB             | $10^{-4}$ to $10^{-6}$ | 37 $^{\circ}\text{C}$ /72 h  | Hartemink and Rombouts, 1999      |
| <b>Clostridium</b>     | TSC            | $10^{-2}$ to $10^{-4}$ | 37 $^{\circ}\text{C}$ /48 h  | Neut <i>et al.</i> , 1985b        |

\* Columbia blood agar (CBA), Bacteroides bile esculine agar (BBE), Raffinose Bifidobacterium medium (RB), Tryptose sulfite cycloserine (TSC)

Colonies were identified after two or three days of incubation at 37 °C under anaerobic conditions and results were expressed as decimal logarithm of the cfu per gram of faecal sample. In the case of bifidobacteria, some colonies were isolated in RB agar (Hartemink and Rombouts, 1999) containing (in grams per liter): agar bacteriological No. 1, 18,0; D(+) raffinose, 7,5; sodium caseinate, 5,0; yeast extract, 5,0; lithium chloride, 3,0; sodium propionate, 15,0; L-cysteine, 0,5; sodium thioglycollate, 0,5; bromocresolpurple 1% solution, 15,0; salt solution (MgSO<sub>4</sub>, 0,2; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0; NaHCO<sub>3</sub>, 10,0; NaCl; 2,0), 40,0; pH 6,7 during 48 hours anaerobically and then they were tested for Gram stain, colony morphology microscopically using OLYMPUS Phase-contrast microscope with optical magnification of x40 and x100, and carbohydrate fermentation pattern using the enzymatic test API 50CH and API 50 CHL broth (Biomerieux, France). After 48 hours of incubation under anaerobic conditions one colony of each plate was inoculated in api 50 CHL medium, then it was pipetted from the medium into the 50 api-microtubes. Then, the api-cupules were filled with paraffine for maintaining anaerobic conditions for the fermentation and thus we incubated the strip at 37 °C for 48 hours. All the previous analysis were performed under anaerobic conditions in an anaerobic chamber.

### 3<sup>rd</sup> STUDY

#### Nutritional composition of the experimental diets

In the third study were used a total of nine diets, the first one was a maintenance diet (A04) for rats provided by the animalarium of the University of Murcia. The remaining eight diets were elaborated from the follow-up and probiotic follow-up infant formulas, being each diet composed by the homogenisation of four cans belonging to the same batch of production.

**Table 7.** Diets used in the *in vivo* experiment to study the effect of follow-up infant formulas containing probiotics, prebiotics and synbiotics on mineral absorption

| Group | Diets          | Composition   |
|-------|----------------|---|
| 1     | A04            | Maintenance diet A04                                      |
| 2     | Control        | Follow-up infant formula                                  |
| 3     | Probiotic      | Follow-up infant formula + bifidobacteria                 |
| 4     | Prebiotic 1,2% | Follow-up infant formula + 4'-GOS (1,2%)                  |
| 5     | Prebiotic 5%   | Follow-up infant formula + 4'-GOS (5%)                    |
| 6     | Prebiotic 10%  | Follow-up infant formula + 4'-GOS (10%)                   |
| 7     | Synbiotic 1,2% | Follow-up infant formula + bifidobacteria + 4'-GOS (1,2%) |
| 8     | Synbiotic 5%   | Follow-up infant formula + bifidobacteria + 4'-GOS (5%)   |
| 9     | Synbiotic 10%  | Follow-up infant formula + bifidobacteria + 4'-GOS (10%)  |

The first study gave rise to the selection of two species of bifidobacteria: *B. bifidum* and *B. longum* (according to their growth and capacity to decrease pH of the media) and a substrate: 4'-GOS (according to its capacity to stimulate the growth of bifidobacteria). Table 7

shows the combination of these probiotics (bifidobacteria) and prebiotics (4'-GOS, at 1,2, 5 and 10%) to elaborate the diets used in the study.

Moisture was determined by weight loss from triplicate samples dried in an oven at 100 °C for 20 hours. The crude protein content was calculated by converting the nitrogen content determined by Kjeldahl digestion (method 991.20 of the AOAC, 1999) and multiplying it using a factor of 6,25. Fat was determined by the method described by the AOAC (1999), using the Soxhlet system. Ash content was carried out according to method 945.46 of the AOAC (1999) by dry-ashing in a furnace oven at 525 °C for 24 hours. Total dietary fiber was determined following the enzymatic-gravimetric method described by Prosky *et al.* (1988) and adapted by the AOAC as the official method 985.29 (AOAC, 1999). Carbohydrates were calculated by subtracting the other components from the total as recommended by FAO/WHO (1982). Energy was estimated by applying the numbers of Atwater. For fat content, the factor was 9 kcal/g and for the carbohydrate and protein contents the factor was 4 kcal/g.

Ca, Mg and Fe analyses were carried out by atomic absorption spectrophotometry (EAA) according to method 945.46 by the AOAC (1999). Samples were dried overnight in a forced-draught oven at 90 °C. Mineral composition was analyzed after destroying the organic matter of the samples by dry ashing in a Nabertherm furnace oven, model L3/P (Liliental, Bremen, Germany) for 24 hours with a final temperature of 525 °C. The ash was subsequently dissolved with a mixture of 2 mL of 65% HNO<sub>3</sub> and 5 mL of 37% HCl on an electrical hot plate. Subsequently, the ash was collected from the crucibles by washing with distilled deionized water and filtered through a Whatman GF/C glass microfiber filter into 50 mL volumetric flasks. Minerals were measured in the final filtrate solution using a Perkin-Elmer atomic absorption spectrophotometer model 3100 (Norwalk, CT, USA). A 10 cm one-slot burner head, impact bead, flow spoiler, corrosion resistant nebulizer and standard air-acetylene flame were used. A monoelemental hollow cathode lamp was used for each element. The instrumental conditions recommended by the manufacturer (wavelength, slit and lamp intensity) were applied (Ros, 1995; Martínez *et al.*, 1998). The acids (Suprapur<sup>®</sup> quality) and the mineral standard solution (Tritisol<sup>®</sup>) used were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). P was determined after dry ashing, in the same conditions applied for the other minerals, using the ammonium vanadate colorimetric method according to method 986.24 (AOAC, 1999), described by Chapman and Pratt (1961), reading the absorbance in a Hitachi H-2000 double beam molecular spectrophotometer.

To minimize the risk of adventitious contamination, all glassware and crucibles were acid-washed overnight in a 6 M solution of analytical grade HCl. Distilled, deionized water was used to rinse all glassware twice. In the determination of Ca and Mg and to avoid interference with other elements, such as phosphates, lanthanum chloride 0,1% (wt/vol) was added to the samples and standards.

## ***In vivo* study with rats of the effect of follow-up infant formulas containing probiotics, prebiotics and synbiotics on mineral absorption**

### **Animals**

Rats were provided by the animalarium of the University of Murcia (institution authorized for production and distribution of laboratory animals according to Real Decreto 223/1988, about animal protection for experimentation and other scientific purposes, published in B.O.E. núm. 67 from 18th March 1988). Rat assays were approved by the Ethical Committee of the University of Murcia. Fifty-four three-week-old weanling male Sprague-Dawley rats (initial body weight 40-50 grams) were housed in collective wire stainless steel cages. During the mineral balance periods the animals were moved to metabolic cages (Techniplastgazzada, Bugugiatte, Italy) in an environmentally controlled room, maintained at  $23 \pm 2$  °C, with a 12 hours light-dark cycle and 50-70% humidity. Rats were selected by initial weight receiving a different diet according to the group.

### **Diets**

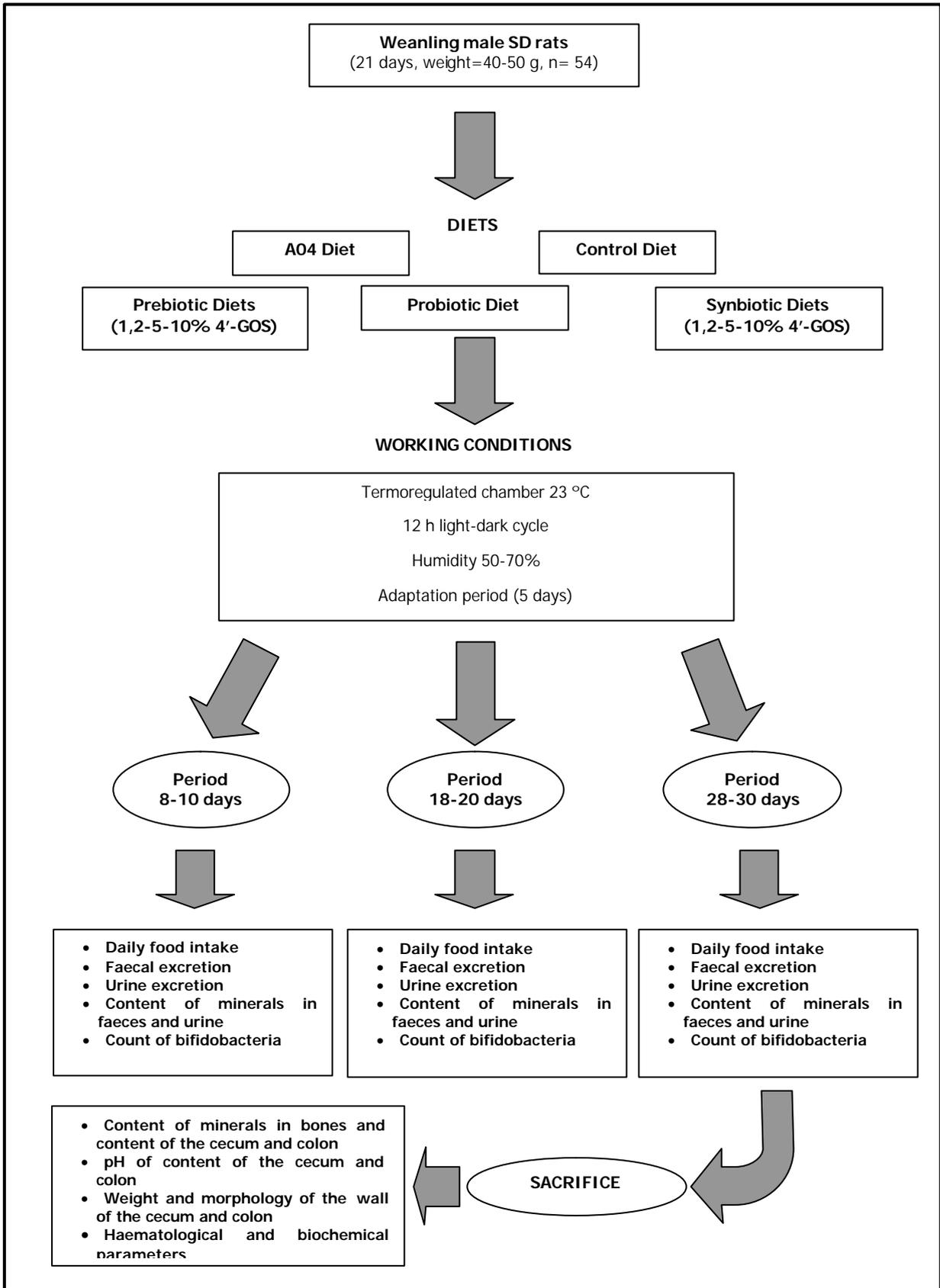
The following table shows the nutritional composition of the nine diets used in the feeding of the rats. All diets cover the rat requirements of the minerals studied in this work and they are established in 500 mg/100 g for calcium, 40 mg/100 g for magnesium, 400 mg/100 g for phosphorous and 3,5 mg/100 g for iron (NRC, 1978).

**Table 8.** Nutritional composition of the diets used in the third study

| <b>Nutrients</b>          | <b>Diets</b> |   |
|---------------------------|--------------|---|
|                           | <b>1</b>     | <b>2-9</b>  |
| Energy (kcal/100 g)       | 317,68±0,01  | 465,80±4,38   |
| Moisture (%)              | 9,05±0,194   | 3,45±0,13   |
| Ash (%)                   | 5,04±0,05    | 3,75±0,04   |
| Protein (%)               | 14,00±0,05   | 13,85±0,13  |
| Fat (%)                   | 2,36± 0,06   | 22,20±0,21  |
| Carbohydrates (%)         | 60,11±0,00   | 52,64±0,59  |
| Dietary fiber (%)         | 18,49±1,81   | -   |
| Calcium (mg/100 g)        | 765,50±15,74 | 571,72±8,67   |
| Iron (mg/100 g)           | 30,41±2,58   | 8,55±0,24   |
| Magnesium (mg/100 g)      | 150,09±0,66  | 50,10±0,86  |
| Phosphorous (mg/100 g)    | 503,98±4,44  | 343,68±9,68   |
| Ratio calcium/phosphorous | 1,52         | 1,66  |
| Galactooligosaccharides   | NO           | { 2, 3...NO<br>4, 7...1,2%<br>5, 8...5%<br>6, 9...10% |
| <i>Bifidobacterium</i>    | NO           | { 2, 4, 5, 6...NO<br>3, 7, 8, 9...YES                 |

## Collection and processing of samples

The experimental design and methodology followed in the *in vivo* study to determine the effect of probiotics and prebiotics on intestinal mineral absorption and retention using a mineral balance technique is shown in Figures 3 and 4. Before starting the experiment, cages, eatables, drinkables, containers for urine and faeces, and containers for other samples were washed in 10% HNO<sub>3</sub> solution and then rinsed three times in deionized distilled water. After a 5-day adaptation period, during which rats were fed the control diet, the animals were separated into nine groups of six rats having similar mean body weight. The animals were also weighted at the end of the study and during the three periods of three days (days 8-10, 18-20 and 28-30) of mineral balance using a scales (Şartorius, Göttingen, Germany). Diets and deionized water were given *ad libitum* for 30 days, recording also the intake of food and water during the periods of mineral balance. Moreover, faeces and urine (acidified by HCl, 0,5 M, 10 mL/L) (Lopez *et al.*, 2000) were collected during these periods for microbial analysis (total faecal bacteria and faecal bifidobacteria) and for mineral balance determination (in both). Faeces were cleaned from any food residue, weighted, lyophilized, milled, and afterwards a sample of 0,5 grams was taken for mineralization. Dry weight of faeces was estimated after drying a sample in an oven until obtaining a constant weight. Urine was filtered (Whatman filter paper 41, ashless, Maidstone, UK) to remove any food and faeces residues and then was filtered again (0,45 µm, Iwaki glass, Japan). Both, faeces and urine were stored at 4 °C. After a 30-day feeding period, the animals were anesthetized by exposure to diethyl ether and posterior to laparotomy, 4-5 mL of blood was collected by aorta puncture. The cecum and colon were removed, pH of the cecal and colonic contents was measured with a glass microelectrode inserted from the ileum and rectum respectively. The cecal and colonic tissues were flushed clean with deionized water, blotted on filter paper and weighted. Subsequently, the cecal and colonic wall were stored in formol solution until histologist study. The cecal and colonic contents were collected, weighted and then stored at -20 °C until needed for mineral analysis. The femur and tibia from the right leg were removed to determine their ash weight and mineral content. Previously the bones were dried in an oven at 95 °C for 24 hours and defatted by two successive passes of 12 hours in *n*-hexane and ether, drying them again in an oven at 95 °C for 5-6 hours to measure their dry weight (Ros, 1995).



**Figure 3.** Experimental design of the *in vivo* experiment to study the effect of follow-up infant formulas containing probiotics, prebiotics and synbiotics on mineral absorption

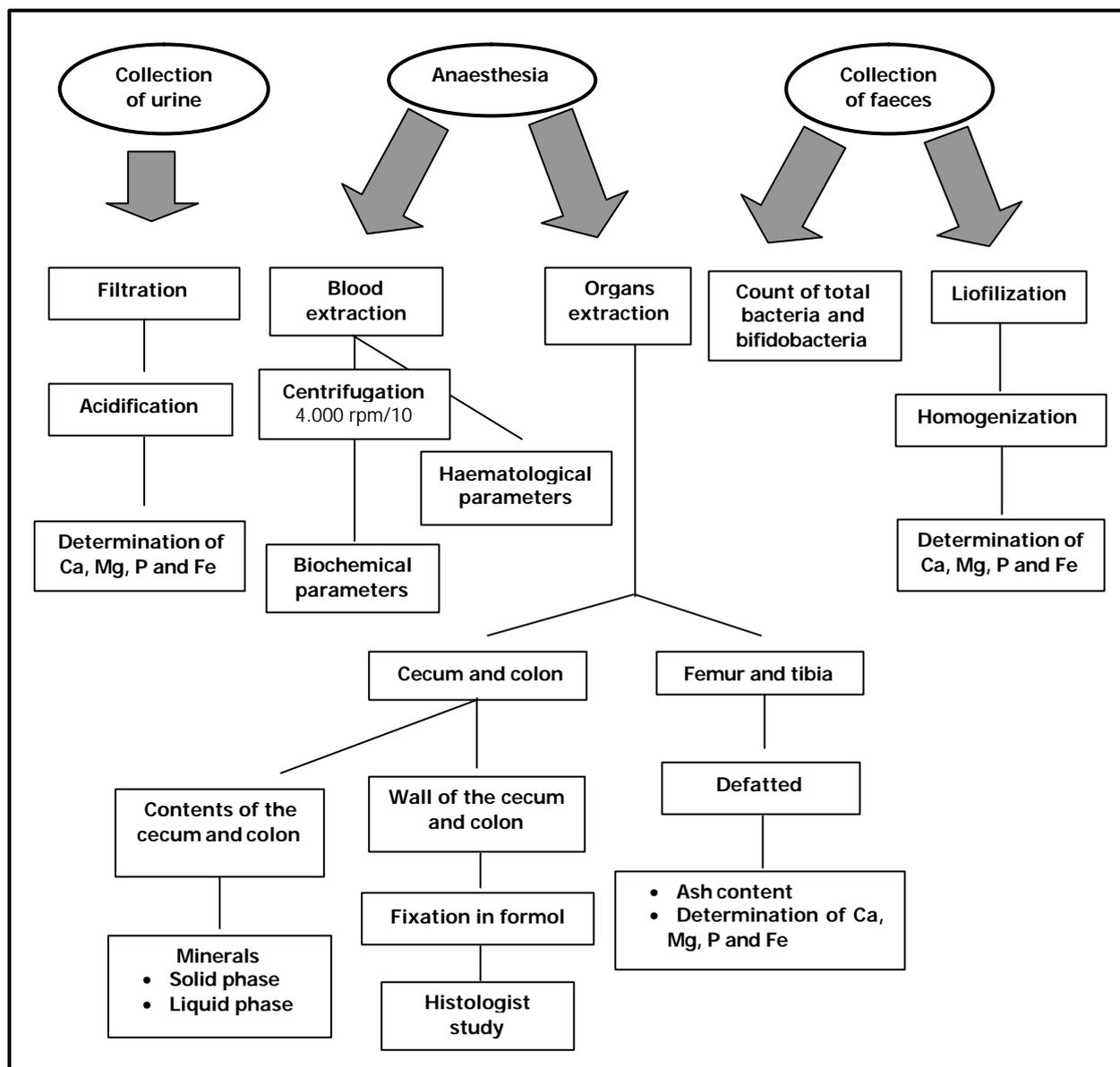


Figure 4. Methodology followed in the *in vivo* study with rats

### Determination of the haematological and biochemical parameters

The haematological parameters were analyzed immediately after collecting the blood to avoid any alteration of the sample. The blood of the animals was analyzed for total red cells, hematocrit and the concentration of hemoglobin were measured using a Microcellcounter Sysmex F-800. A portion the blood sample was centrifuged at 4.000 x g for 10 min for determining the biochemical parameters. Serum iron and total iron binding capacity (TIBC) were analyzed by means of commercial test kits (Ferrimat-kit and TIBC Additif-kit, BioMérieux, France) using a molecular absorption spectrophotometry (Hitachi U-2000, Japan) at 562 nm. The numeric values were calculated from the following formula:

$$\text{TIBC } (\mu\text{g}/100\text{mL}) = \frac{A_m \text{ TIBC} - A_{bm} \text{ TIBC}}{A_p} \times n$$

where  $A_m$  is the absorbance of the problem sample,  $A_{bm}$  the absorbance of the blank,  $A_p$  the absorbance of the standard and  $n$  is the conversion factor with a value of 200.

$$\text{Serum iron } (\mu\text{g}/100\text{mL}) = \frac{A_m - A_{bm}}{A_p} \times n$$

where  $A_m$  is the absorbance of the problem sample,  $A_{bm}$  the absorbance of the blank,  $A_p$  the absorbance of the standard and  $n$  is the conversion factor with a value of 600.

Albumin was determined using the colorimetric test "Bromcresol green" and urea was calculated with the kinetic test GLDH method. The colorimetric reaction in both test were measured in a in a molecular absorption spectrophotometry at 630 and 340 nm, respectively.

Blood lipids were determined by using commercial test kits and analyzed in a molecular absorption spectrophotometry (Hitachi U-2000, Japan) at 600 nm. Total cholesterol, HDL-cholesterol and triacylglycerols were determined with the ABX Diagnostics Cholesterol 250, cholesterol-hdl Spinreact and ABX Diagnostics Triglycerides 25 kits, respectively. LDL-cholesterol was calculated by the following formula:

$$\text{LDLcholesterol} = \frac{\text{Totalcholesterol} - \text{HDLcholesterol} - \text{Triacylglycerols}}{5}$$

### **Enumeration of total bacteria and bifidobacteria in faeces of rats**

All bacteria determinations were done immediately after sampling. About 1 g of fresh faeces collected directly from each rats were immediately diluted in 9 mL of phosphate buffer (Macfarlane and Englyst, 1986; Ingham, 1999) and kept at 22 °C for 30 min until dispersion of the faecal sample. Then serial decimal dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-6}$ ) with peptone water 0,1% (wt/vol) were made, and 1 mL of the faecal homogenised was poured on the different culture media per duplicate as Table 9 shown. The plates were incubated at 37 °C under aerobic and anaerobic conditions during 24-48 hours for total aerobes and anaerobes, and anaerobically at 37 °C during 72 hours for bifidobacteria. The results were expressed as log cfu/g faeces.

**Table 9.** Culture media used in the enumeration of total bacteria and bifidobacteria in faeces of rats

| Bacteria        | Culture media                     | References                      |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Total aerobes   | Plate Count Agar (PCA)            | Alles and col., 1999            |
| Total anaerobes | Reinforced Clostridial Agar (RCA) | Venketeshwer Rao and col., 1994 |
| Bifidobacteria  | TPY Agar with antibiotic solution | Moreno and col., 2000           |

### Determination of the mineral content

After drying and obtaining dry weight of faeces, bones (femur and tibia) and solid phase of the cecal and colonic contents, they were dry ashed in an furnace oven at 550 °C during 12 hours. For a better ashing of the samples, 2 mL of 65% HNO<sub>3</sub> were added, then ash was boiled on an electrical hot plate and they were dry ashed at 550 °C for additional 5 hours following the method described by Sherman *et al.* (1985). Minerals (Ca, Mg, Fe and P) were determined as previously was described. Liquid samples (urine and liquid phase of cecal and colonic contents) did not suffer any additional treatment from that previously described and were directly measured for mineral determination.

### Determination of the mineral content in the solid and liquid phases of the contents of cecum and colon

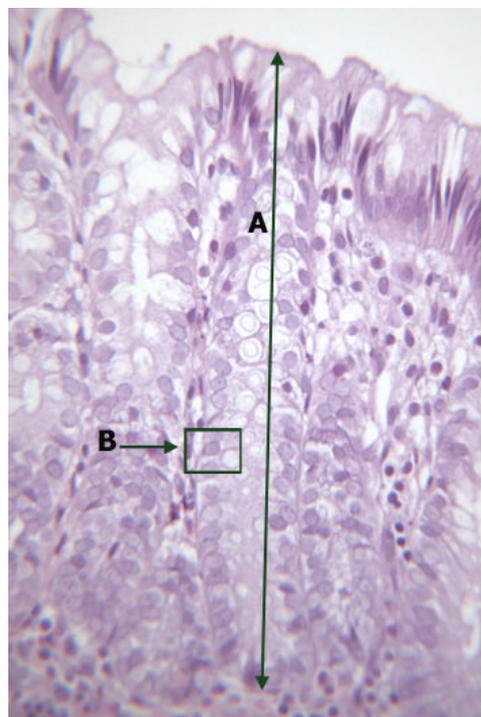
Cecal and colonic contents were thawed and a part of them was added to five volumes of deionized water. The contents were then shaken and centrifuged (15 min, 40.000 x g) with the use of a high speed centrifuge (5416 model, Eppendorf, Hamburg, Germany). Supernatant fraction and pellet were separated and weights were determined. The pellet was dry ashed in an furnace oven at 550 °C during 12 hours dissolving ashes in a mixture of 1 mL of 6 mol/L HCl and 4 mL of distilled deionized water on an electrical hot plate. Ca and Mg in cecal and colonic contents were analyzed in the presence of 0,1% (wt/vol) lanthanum chloride by EAA (Schulz *et al.*, 1993; Baba *et al.*, 1996).

The distribution of minerals between the solid and liquid phase of both cecal and colonic content was calculated. The pellet obtained after centrifugation of the contents comprises the solid phase contaminated with liquid phase. Weight of the solid phase was obtained after drying the pellet. Weight of the liquid phase was calculated as the sum of weights of the liquid phase in the pellet (total pellet weight minus solid phase) and supernatant. The concentration of minerals in the supernatant was taken for that in the liquid phase. The amount of minerals in the solid phase was calculated as that in the total pellet minus that in the liquid phase of the pellet. Multiplying mineral concentration in the supernatant by the weight of the liquid phase gave the amount of minerals in the liquid phase (Schulz *et al.*, 1993).

## Histologist study of the epithelium of the wall of cecum and colon

Elaboration of the histological preparations. After removing, washing, drying and weighting of cecal and colonic walls, they were fixed in a 10% (vol/vol) formol solution until processing. Tissues were removed from the formol solution and sections of 5-7 mm were cut from apex of cecum, proximal (1 cm distal to ceco-colonic junction) and distal (1 m proximal to the rectum) colon (Howard *et al.*, 1995a) and embedded in paraffin blocks. A 4  $\mu\text{m}$  thick cross section was prepared from each specimen and mounted on microscope glass slides, then they were stained with hematoxylin and eosin (Rémésy *et al.*, 1993; Ichikawa and Sakata, 1998; Lu *et al.*, 2000).

Measurement of epithelial proliferation in the histological preparations. The prepared slides were coded and they were observed using an Axioskop Zeiss light microscope with optical magnification of x 10, x 20, x 40 and x 60. One biopsy was taken from each intestinal segment and seven well-oriented and longitudinally sectioned crypts were examined on each biopsy specimen (an average of 21 readable crypts were attained for each segment and for each group fed a different diet) using the MIP 4 Advanced computer programme. The morphological measurements of the stained slides included the linear distance from the base to the mouth of the crypt (crypt depth) and the number of epithelial cells of the right side of axial crypt sections or number of cells per crypt column (cell density) (Howard *et al.*, 1995a; Ichikawa and Sakata, 1998) as it is shown in Figure 5.



**Figure 5.** Image of the epithelial crypts in the proximal colon of the rat. A shows the crypt depth measured in  $\mu\text{m}$ , and B shows the nucleus of one of the epithelial cell.

## Calculations for the evaluation of mineral balance

The apparent absorption ratio and retention ratio of minerals were determined by the following equations:

$$\text{Apparent absorption ratio (\%)} = \frac{(\text{mineral intake} - \text{faecal mineral excretion}) \times 100}{\text{mineral intake}}$$

$$\text{Retention ratio (\%)} = \frac{(\text{mineral intake} - \text{faecal mineral excretion} - \text{urinary mineral excretion}) \times 100}{\text{mineral intake}}$$

## Validation of mineral determination

The method validation for mineral determination was performed by using a curve of calibration and a correlation factor for each mineral. To evaluate the accuracy of the analytical method the recovery rates was calculated by adding known concentrations of the standards to each type of sample, and the percentage recovery was determined. To establish the within-run precision, one sample chosen at random was measured 18 times in the same day, and for the between-run precision the samples were measured 10 times in different days within 3 weeks for each mineral.

## Statistical analysis

In the three studies which the present thesis has been divided, the sources of variation measured in each study (evaluation of bifidobacteria growth, evaluation of the viability of bifidobacteria, addition of probiotics and prebiotics to infant formulas) have been checked with a variance analysis (ANOVA), using the null hypothesis of no differences among means of variables measured. In the cases that statistical differences due to the previous sources of variation were found, a multiple by couples comparison test was carried out using Tukey and Dunnett analysis. Tuckey test was employed to compare the effect of the diets among problem groups, while Dunnett test (bilateral contrast proof) was used to compare each problem group with the control group.

In the third study were done the additional analyses which are described as follow. The relationship between mineral balance (mineral apparent absorption and mineral retention) and mineral content in femur and tibia with the parameters measured in the intestinal lumen (pH contents and mucosa proliferation: crypt depth and cell density) was determined by a correlation analysis. Thus, the effect of the different diets is controlled, using the Pearson's correlation coefficient. To predict mineral absorption from the pH and mucosa proliferation was carried out a simple or multiple lineal regression analysis by successive steps technique. Finally,

to explain the mineral deposition in bones beginning with the studied variables it was used the a factorial analysis "Principal Components Analysis" (PCA). The factorial analysis was used to reduce the data for identifying a small number of factors or variables which explains the majority of the observed variance. In this way hypothesis related to the mechanisms of mineral deposition in bones can be generated, by the linearity of the variables or the relationship of proximity (or dissimilarity) according to their disposition in the metric space represented by all the variables.

In all cases a value of  $p < 0,05$  was considered as significant. The results of this thesis are showed as the mean and standard error obtained from the experiments which were independently replicated three times in a completely randomized design in the two first studies. In the third study, results are showed from six rats per diet. Statistical analysis was conducted using SPSS 10.0 version for Windows.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1<sup>st</sup> STUDY

#### ***In vitro* evaluation of bifidobacteria growth and pH variation of the culture broth with different non-digestible oligosaccharides (NDO)**

The growth of a bacterial culture could be expressed as the increase in the mass of the culture or in the number of cells. Among the methods used to measure the bacterial mass in an indirect way, the turbidimetric (optical) methods are widely followed. The principle of these methods is to measure the amount of light dispersed or transmitted through a bacterial culture and it is, within certain limits, proportional to the mass of the culture. One of the most useful methods is the measurement of the transmitted light using the Macfarland scale (Meyer *et al.*, 1985).

Many *in vitro* studies have evaluated the fermentation of different oligosaccharides by lactic-acid bacteria, bifidobacteria particularly, and also the bacterial growth using optical density (OD) at different wavelengths (Gómez Zavaglia *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2000a; Crittenden *et al.*, 2001; Perrin *et al.*, 2001).

**Table 10** shows the two-way ANOVA of bacterial growth (OD and log cfu/mL) and pH of the broth according to the substrate used, incubation time and the interaction of both. The utilization of five different substrates affected significantly ( $p < 0,001$ ) on pH of the broth and bacterial growth of the four microorganisms studied. Progress of time (from day 1 to 7) also affected significantly ( $p < 0,001$ ) on bacterial growth expressed as OD and log cfu/mL and pH of the broth. The interaction of both factors was a source of variation for pH oscillation and bifidobacteria growth since the measurements of bacterial growth and pH for a determined substrate and day, showed significant differences ( $p < 0,001$ ) for each microorganism.

**Table 10.** Two-way ANOVA of culture broth pH and growth of 4 species of bifidobacteria (OD and log cfu/mL) using the substrate, time of incubation and the interaction of both as source of variation

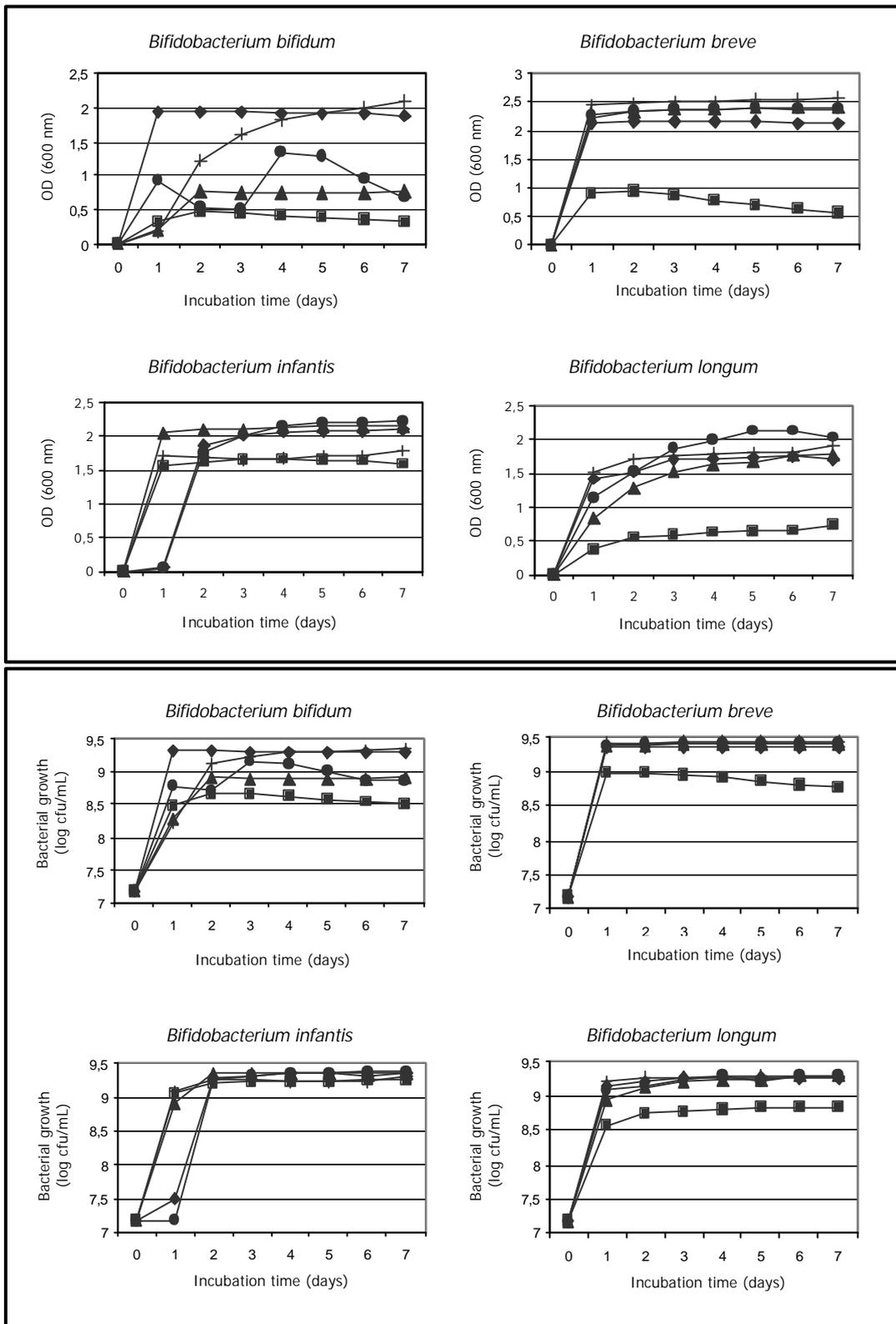
| Source of variation | <i>B. bifidum</i> |     |         | <i>B. breve</i> |     |         | <i>B. infantis</i> |     |         | <i>B. longum</i> |     |         |
|---------------------|-------------------|-----|---------|-----------------|-----|---------|--------------------|-----|---------|------------------|-----|---------|
|                     | pH                | OD  | log cfu | pH              | OD  | log cfu | pH                 | OD  | log cfu | pH               | OD  | log cfu |
| Substrate (S)       | ***               | *** | ***     | ***             | *** | ***     | ***                | *** | ***     | ***              | *** | ***     |
| Time (T)            | ***               | *** | ***     | ***             | *** | ***     | ***                | *** | ***     | ***              | *** | ***     |
| S x T               | ***               | *** | ***     | ***             | *** | ***     | ***                | *** | ***     | ***              | *** | ***     |

Statistical significance: \*\*\* $p < 0,001$

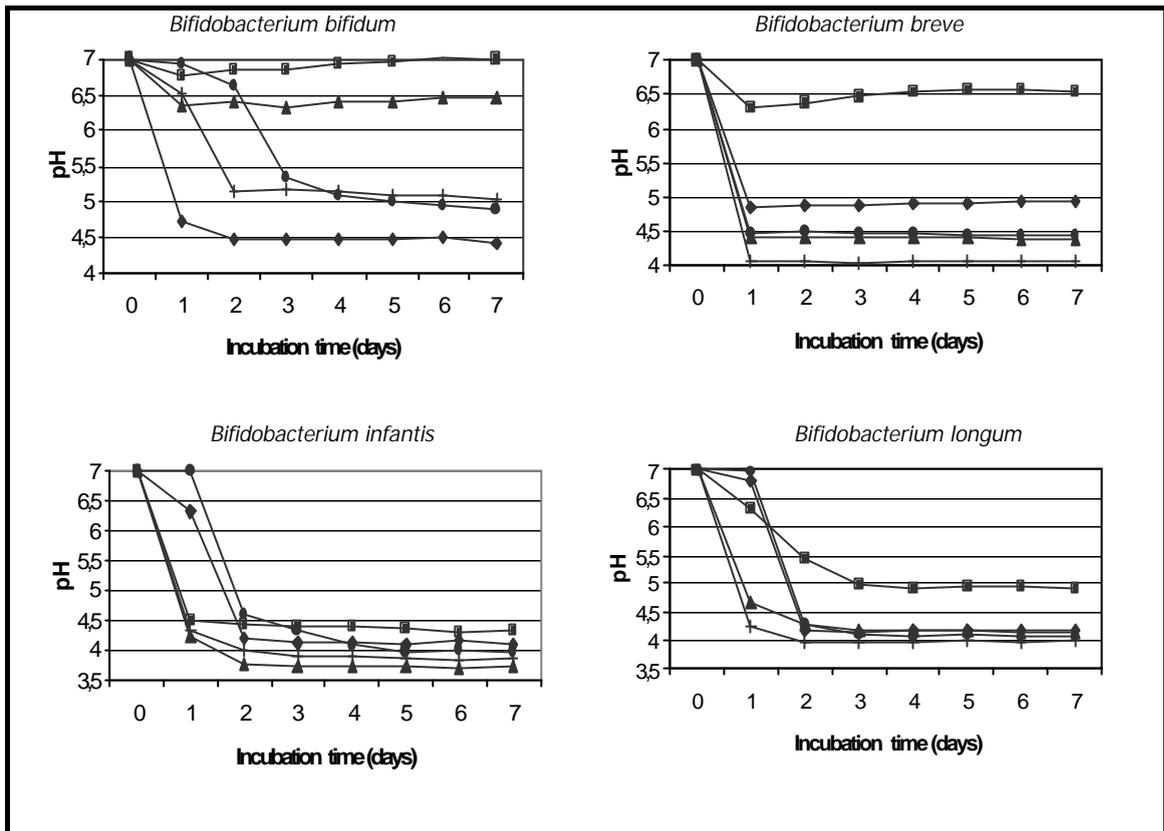
**Figure 6** shows the bacterial growth, expressed as OD and log cfu/mL, along the seven days of incubation of the bifidobacteria with five different substrates. A relationship between the OD of the culture broth and the bacterial concentration expressed as cfu/mL using the MacFarland scale was established. In general, the trend of bacterial growth followed a similar pattern, except *B. bifidum*, with a exponential growth at 24 hours of incubation and then a

more supported growth until the seventh day of incubation. In the case of *B. bifidum*, was observed a fast and exponential growth with glucose as substrate, while with SCFOS the growth was more supported and it decreased in the last three days. With the rest of substrates a clear growth did not appear till the second day, being lower with oligofructose and inulin. However, with 4'-GOS the bacterial growth was increasing progressively up to obtain the highest growth at the end of the incubation (seventh day). *B. breve* showed an exponential growth with all the substrates in the first 24 hours except with inulin, and it was maintained until the last day. However, the bacterial growth observed with inulin was smaller, and from the third day it decreased slightly. For *B. infantis*, the exponential growth with SCFOS and glucose was observed, and appears in the second day. With all the substrates it was obtained a similar growth, except for 4'-GOS and inulin which was smaller. In the case of *B. longum*, it was reproduced the trend of growth described previously except for inulin, which the exponential phase of growth was very small and the growth with this substrate along the seven days was smaller than with the other carbohydrates.

In **Figure 7** it is observed the variations of pH of the culture broth throughout seven days of incubation of four species of bifidobacteria with five substrates. In the moment of adding the inoculum the pH of the broth was 7,00, and except for SCFOS as substrate with *B. bifidum* (6,94), *B. infantis* (7,00) and *B. longum* (6,96), inulin with *B. bifidum* (6,78) and glucose with *B. longum* (6,81), it was observed a decrease of 0,5 points in the first 24 hours. In the case of *B. bifidum*, the addition of inulin to the culture broth practically did not modify the pH, and with oligofructose the pH of the broth only dropped in 0,5 points. With the rest of substrates the decrease of the pH was more noteworthy, standing out the case of glucose. For *B. breve*, except with inulin which pH only decreased to 6,5, it was produced an important drop in pH with values ranging between 4 and 5. The culture of *B. infantis* at 24 hours of incubation with all the substrates it was obtained pH values around 4,5 except for SCFOS which was maintained practically in 7 and with glucose pH broth decreased to 6,32. However, from the second day all pH values were kept till the end of the study between 4,50 and 3,50. In the case of *B. longum*, only glucose and 4'-GOS produced a significant descent of pH at 24 hours. Nevertheless, with inulin the pH showed the smaller values (5,0).



**Figure 6.** Graphics of the means obtained for the interaction of substrate and time of incubation, showing bifidobacteria growth (*Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*) as changes in OD and log cfu/mL. Glucose (◆) and different oligosaccharides [SCFOS (●), inulin (■), oligofructose (▲) and 4'-GOS (+)] were used as substrates



**Figure 7.** Graphics of the means obtained for the interaction of substrate and time of incubation, showing pH changes in TPY broth [glucose (◆), SCFOS (●), inulin (■), oligofructose (▲) and 4'-GOS (+)] using different bifidobacteria (*Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*)

The use of the MacFarland scale has the disadvantage to be a method not very exact, for this reason it has been displaced by spectrophotometric methods which measure the OD of the culture, that is the absorbance (Meyer *et al.*, 1985). Therefore, in **Table 11** is shown the final growth values (OD) of bifidobacteria and the pH of the culture broth after seven days of incubation with five different carbohydrates. It could be established that in the seventh day of incubation and for all bifidobacteria, the substrates 4'-GOS and SCFOS were which stimulated more strongly the bacterial growth (2,07 in *B. bifidum* and 2,59 in *B. breve* for 4'-GOS and 2,22 in *B. infantis* and 2,03 in *B. longum* for SCFOS). In the other hand, inulin was the substrate which less effect on the bacterial growth in all the cases after seven days of incubation. Regarding to pH values of the culture broth in the seventh day of incubation, again the substrates 4'-GOS and SCFOS were which produced a higher decrease in the pH of the culture broth, and inulin was which less dropped the pH at the end of the study. A relationship between bacterial growth and pH decrease could be found, which is more noticeable for *B. breve* and *B. longum*. In the other two species of bifidobacteria can not be established this relationship, due that *B. bifidum* obtained a greater growth with 4'-GOS and a more pronounced decrease of pH when it was incubated with glucose and SCFOS, and *B. infantis* showed a higher growth with SCFOS but however, with oligofructose and 4'-GOS showed a smaller pH in the culture broth.

**Table 11.** Values of optical density (OD) and culture broth pH at seventh day of bifidobacteria incubation

| <b><i>Bifidobacterium</i> spp.</b> | <b>Substrate</b> | <b>OD</b>               | <b>pH</b>                |
|------------------------------------|------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>B. bifidum</i>                  | glucose          | 1,88±0,001 <sup>b</sup> | 4,40±0,020 <sup>e</sup>  |
|                                    | SCFOS            | 0,68±0,002 <sup>d</sup> | 4,89±0,015 <sup>d</sup>  |
|                                    | inulin           | 0,34±0,001 <sup>e</sup> | 7,02±0,026 <sup>a</sup>  |
|                                    | oligofructose    | 0,77±0,002 <sup>c</sup> | 6,42±0,025 <sup>b</sup>  |
|                                    | 4'-GOS           | 2,07±0,001 <sup>a</sup> | 5,04±0,015 <sup>c</sup>  |
| <i>B. breve</i>                    | glucose          | 2,14±0,001 <sup>d</sup> | 4,94±0,020 <sup>b</sup>  |
|                                    | SCFOS            | 2,38±0,001 <sup>c</sup> | 4,45±0,010 <sup>c</sup>  |
|                                    | inulin           | 0,57±0,003 <sup>e</sup> | 6,56±0,020 <sup>a</sup>  |
|                                    | oligofructose    | 2,39±0,001 <sup>b</sup> | 4,42±0,036 <sup>c</sup>  |
|                                    | 4'-GOS           | 2,59±0,001 <sup>a</sup> | 4,06±0,015 <sup>d</sup>  |
| <i>B. infantis</i>                 | glucose          | 2,09±0,002 <sup>c</sup> | 4,09±0,020 <sup>b</sup>  |
|                                    | SCFOS            | 2,22±0,002 <sup>a</sup> | 3,89±0,083 <sup>bc</sup> |
|                                    | inulin           | 1,59±0,012 <sup>e</sup> | 4,33±0,015 <sup>a</sup>  |
|                                    | oligofructose    | 2,17±0,004 <sup>b</sup> | 3,75±0,046 <sup>c</sup>  |
|                                    | 4'-GOS           | 1,79±0,017 <sup>d</sup> | 3,87±0,017 <sup>c</sup>  |
| <i>B. longum</i>                   | glucose          | 1,70±0,007 <sup>d</sup> | 4,20±0,020 <sup>b</sup>  |
|                                    | SCFOS            | 2,03±0,031 <sup>a</sup> | 4,09±0,026 <sup>d</sup>  |
|                                    | inulin           | 0,74±0,002 <sup>e</sup> | 4,94±0,030 <sup>a</sup>  |
|                                    | oligofructose    | 1,78±0,002 <sup>c</sup> | 4,15±0,015 <sup>c</sup>  |
|                                    | 4'-GOS           | 1,91±0,010 <sup>b</sup> | 4,00±0,006 <sup>e</sup>  |

Values are mean±SE, n=3

<sup>a-e</sup> Means with unlike superscript letter are significantly different by Tukey's test (p<0,001)

Therefore, we conclude that in general inulin was the substrate with minor effectiveness in bifidobacteria growth and its fermentation produced a pH decrease of the culture broth less noticeable. This fact agrees with that described by Shin *et al.* (2000a) who evaluated the growth of two commercial strains of *B. bifidum* in fermented skim milk in the presence of SCFOS, GOS and inulin. They observed that inulin was the less effective in bacterial growth after 48 hours of incubation at 37 °C. The authors described that it was necessary a 5% of inulin to observe significant differences (p<0,05) with the control. Moreover, acetic and lactic acid production measured in the culture was smaller (p<0,05) in the strains which grew with inulin.

Recently, Crittenden *et al.* (2001) evaluated *in vitro* the growth of *B. lactis* B94 with different oligosaccharides and monosaccharides. They reported that *B. lactis* B94 growth better in the presence of FOS, GOS and xylooligosaccharides (XOS) than with their monosaccharide moieties fructose, galactose and xylose, showing a growth values measured as OD at 600 nm in decreasing order: glucose (1,9) > GOS (1,6) > SCFOS (1,2) > oligofructose (1,0) > inulin (0,7). Our data showed a similar trend to that described by Crittenden *et al.*, with 4'-GOS and SCFOS as the substrates exhibiting the higher bacterial growth along the seven days of incubation with any of the bifidobacteria tested. A possible explanation for the differences found in the carbohydrate fermentation is the degree of polymerization (DP). Therefore, while inulin has the higher DP (between 10 and 60), SCFOS and 4'-GOS have smaller DP (2-3 and 3-5, respectively). It has been described by *in vitro* fermentation of inulin and derived products of its hydrolysis by faecal human bacteria, that the molecules with a DP < 10 are fermented twice faster than those with a DP > 10 (Roberfroid *et al.* 1998). This phenomena has been observed

also in bifidobacteria by some authors (Gibson and Wang, 1994a; Hopkins *et al.*, 1998; Bielecka *et al.* 2002). Moreover, it has been suggested that these microorganisms have mechanisms of transport for specific substrates, which are more efficient in OND transport than for simple sugars. However, in our study the fermentation of glucose led to a higher bacterial growth than inulin with the four species of bifidobacteria. In a study of *in vitro* fermentation using a range of monosaccharides (arabinose, xylose, mannose, galactose and glucose), the higher growth rates were reached with the two last sugars. *B. longum*, *B. bifidum* and *B. infantis* preferred glucose as substrate, while *B. breve* showed a greater growth with galactose (Degnan and Macfarlane, 1991).

With regard to the acidification of the culture broth, *B. breve* and *B. longum* showed the most acidic pH in the presence of 4'-GOS after seven days of incubation. *B. infantis*, was the species with the lowest values of pH in presence any of the substrates used.

In a synthetic media, bifidobacteria produce 3 mol of acetic acid and 2 mol of lactic acid from 2 mol of glucose (Scardovi and Trovatielli, 1965). Although we did not measure the acids produced in the broth after the fermentation of the carbohydrates, it could be mentioned that bifidobacteria produced the greatest amount of these acids in the presence of 4'-GOS which are the characteristic metabolites produced during the anaerobic fermentation of carbohydrates. The values of pH obtained in the present study could be considered low comparing to other studies, however some authors have found similar values. Then, Dubey and Mistry (1996) evaluated the growth of four bifidobacteria (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* and *B. longum*) in three infant formula during 24 hours. *B. bifidum* and *B. breve* showed the lowest pH (4,1 and 4,0, respectively) with an infant formulas based on hydrolyzed casein. In our study the lowest pH values in presence of 4'-GOS at 24 hours of incubation were found with *B. breve* and *B. longum* (4,08 and 4,16, respectively) to conclude with values of 4,06 and 4,00 respectively, at seventh day. However, Ustunol and Gandhi (2001) evaluated the growth of two strains of *B. bifidum* in reconstituted nonfat dry milk containing 5% honey (oligosaccharides make up 4 to 5% of its composition), sucrose, fructose or glucose during 48 hours. pH values were 3,61 with honey and 3,67 with glucose at 48 hours of incubation. This low pH found with honey was as a consequence of a higher concentration of acetic and lactic acid when this substrate was used. In our study, *B. bifidum* obtained the lowest pH (4,46) in presence of glucose at 48 hours, while with the remaining substrates pH did not decrease below 5. In other study with longer incubation, Marx *et al.* (2000) described that the growth of *B. breve* and *B. longum* reached its higher level after 20-25 hours of incubation in the presence of  $\beta$ -(2,6)-FOS, and it remained constant till the fifth day of incubation. During growing pH values of the media decreased, mainly due to the organic acids production. Initial pH was 6,5 and it decreased to 5,0 with *B. breve*, and 5,3 with *B. longum* at 24 hours and it was maintained practically stable until the end of the study. As it was described previously, in our study the phase of higher bacterial growth

and broth acidification it was produced in the first 24 hours, and both remained constant during the rest of the study.

The lower pH values found with *B. breve* and *B. infantis* when they were grown in the culture broth containing 4'-GOS with respect to SCFOS and inulin also it was described by Kajiwara *et al.* (2002) after incubating these two bifidobacteria in the presence of 5% GOS, SCFOS and inulin during 48 hours. For both bifidobacteria this fact was due to the greatest lactic acid production.

Rycroft *et al.* (2001) evaluated the *in vitro* fermentation of different oligosaccharides by bifidobacteria during 24 hours, and they reported that the oligosaccharides containing galactose (lactulose, GOS and soybean-oligosaccharides (SOS)) were more effective than those containing fructose (oligofructose and inulina) in enhancing bifidobacteria growth. Moreover, the authors concluded that isomalto-oligosaccharides (IMO) and GOS appeared to be effective prebiotics as they increased numbers of bifidobacteria with little effect on the other bacterial groups (clostridia, bacteroides, lactobacilli, streptococci and *E. coli*), increasing significantly lactic acid production and produced the lowest gas volumes. This fact was also observed by Djouzi and Andrieux (1997) in a study using rats inoculated with a human faecal flora, where GOS increased bifidobacteria populations to a greater extent than FOS.

From the results of the present study we may affirm that of the substrates used, 4'-GOS was that which stimulated more intensively the *in vitro* the growth of the bifidobacteria often found in infant faeces. *B. breve* and *B. bifidum* were the two species with higher growth rates in the presence of 4'-GOS, while *B. breve* and *B. longum* showed the lower pH values in the culture broth when they were grown with the substrate selected as prebiotic (4'-GOS).

With the results obtained in this first study, the next step was to use a commercial infant formula for elaborating different diets with the probiotics and prebiotics previously selected. Because of the elaboration of a probiotic infant formula will suppose to have a very strict anaerobic and asepsia conditions in the moment of adding of the probiotic bacteria, we decided to select the commercial probiotic infant formula containing the strains selected in the first study. Therefore, it was selected a probiotic infant formula containing *B. bifidum* and *B. longum*, two of the species more often isolated in breast-fed infants (Mitsuoka, 1982; Rasic and Kurmann, 1983), and an infant formula without bifidobacteria to use it as the base of the probiotic formula. For elaborating the prebiotic infant formulas, it was used the same commercial infant formula to that different concentrations of 4'-GOS were added. Furthermore, adding the prebiotic selected to the probiotic infant formula was elaborated the synbiotic infant formula.

## 2<sup>nd</sup> STUDY

Based on the results obtained in the first study, it was selected a commercial probiotic infant formula containing *B. bifidum* and *B. longum* because they were two of the species with the best *in vitro* growth rates in the presence of the NDO (4'-GOS) proposed as prebiotic in the previous study. The aim of the second study was evaluate the viability of the bifidobacteria present in the probiotic infant formula during the time of consumption, according to the manufacturer conditions. Depending on infant age this period of time range between six and fourteen days.

### 1. Viability of bifidobacteria in commercial powder infant formula

Some studies (Klaver *et al.*, 1993; Dave and Shah, 1997) have shown that bifidobacteria grow poorly in milk and do not survive well in the final product. Maintaining viability of bifidobacteria in milk and in fermented dairy foods has been a challenge to the dairy manufacturers because the bacteria requires low oxidation reduction potential for growth (Shimamura *et al.*, 1992) and it is sensitive to low pH, conditions not occurring naturally in fermented milk. The organism also requires specific growth factors (Klaver *et al.*, 1993; Modler, 1994). However, various researches have reported on the viability of bifidobacteria in dairy products, such as fermented milk (Medina and Jordano, 1994), cheese (Roy *et al.*, 1997), frozen fermented desserts (Laroia and Martin, 1991), ice-cream (Hekmat and McMahon, 1992) and yogurt (Shah *et al.*, 1995).

To provide health benefits, the recommended rules for probiotic bacteria are to be viable in the product and be ingested in numbers  $\geq 10^6$  cfu/g (Kurmman and Rasic, 1991). In Japan, the Fermented Milks and Lactic Acid Beverages Association has already established a standard that requires  $\geq 10^7$  viable bifidobacteria/mL to be present in dairy products that claim to contain bifidobacteria (Ishibashi and Shimamura, 1993). The Swiss Food Regulation as well as the International Standard of FIL/IDF requires that such products contain  $\geq 10^6$  cfu/g of bifidobacteria (Shin *et al.*, 2000b).

The main factors claimed to promote loss of viability of probiotic bacteria in dairy products include the decrease pH of the medium and the accumulation of organic acids as a result of bacterial growth and fermentation of the substrates available in the dairy product (Shah and Jelen, 1990). Moreover, because of bifidobacteria is an anaerobic specie, a rapid decline in their numbers in food might due to the dissolved oxygen, to its derivatives hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals (Carlsson *et al.*, 1978), and oxygen permeation through the package. The availability of growth factors also affects the viability of probiotic strains in dairy products (Shah, 2000).

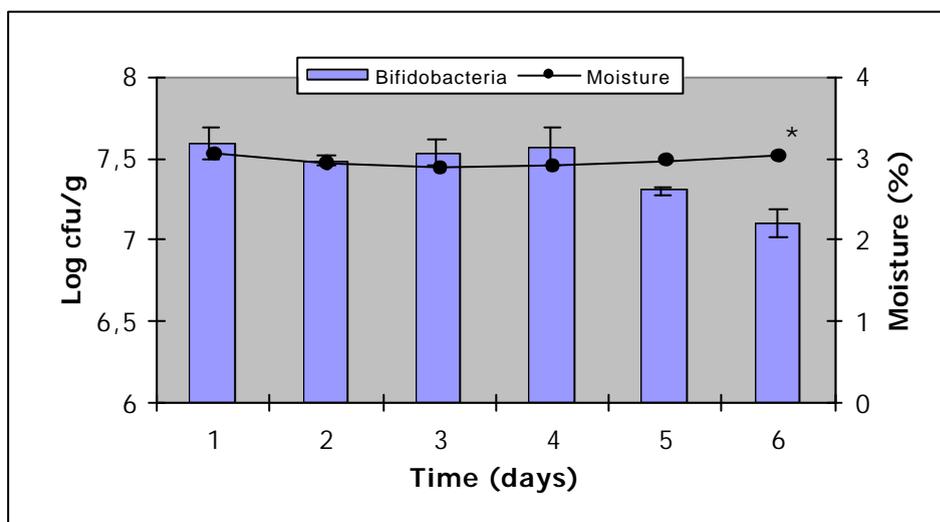
In **Table 12** is shown the one-way ANOVA of the count of bifidobacteria, pH and moisture of probiotic infant formula in the studies of six and fourteen days, which display the minimum and maximum periods of consumption of the formula by infants. In all the cases, except moisture in the study of six days, there were significant differences ( $p < 0,01$ ) along the time in variables studied, not producing a loss in the minimum effective dose of bifidobacteria in the product, as it is shown in the two following Figures (8 and 9).

**Table 12.** One-way ANOVA of the count of bifidobacteria in the infant formulas during the period of consumption by infants (6 and 14 days)

|          | Viability in 6 days | Viability in 14 days |
|----------|---------------------|----------------------|
| log cfu  | **                  | ***                  |
| pH       | ***                 | ***                  |
| Moisture | NS                  | **                   |

Statistical significance: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; NS=not significant

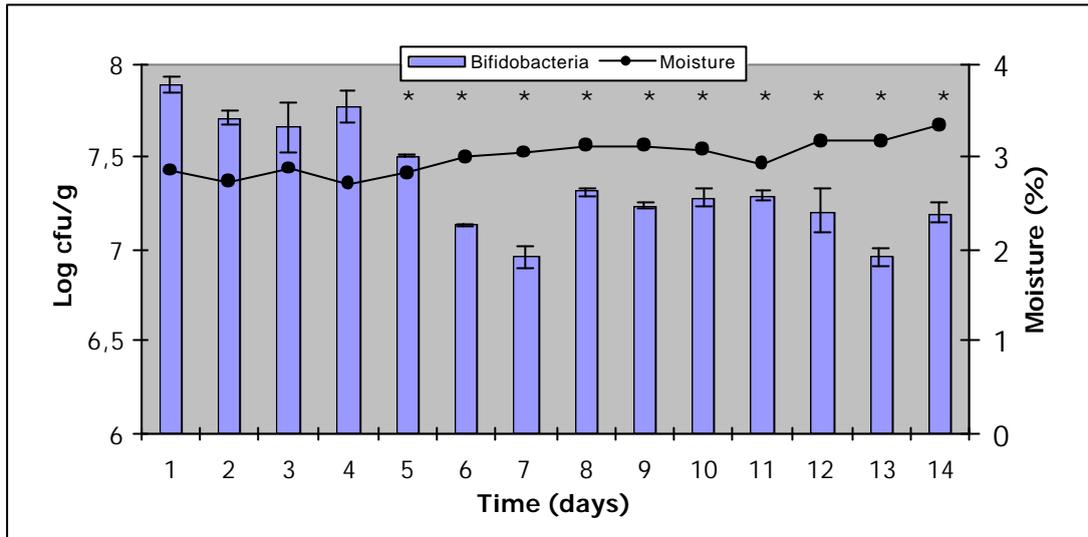
**Figures 8** and **9** show the evolution of the number of bifidobacteria in the probiotic infant formula (PIF) in both six and fourteen days studies. The infant formula used as base for elaborating the probiotic infant formula and therefore, it does not have bifidobacteria in its composition was used as control infant formula (CIF). The results obtained with CIF are not shown because no bacteria was detected during the fourteen days of the study.



**Figure 8.** Viability of bifidobacteria in infant formula and moisture during time of consumption (6 days).

\* Asterisks in the bars show significant differences ( $p < 0,05$ ) by bilateral separate means test in viability of bifidobacteria (log cfu/g) at days 2 to 6 with respect to 1<sup>st</sup> day

In the first study (Figure 8) samples from PIF were taken during six consecutive days. Initial counts showed a value of 7,59 log cfu/g of sample with no significant differences ( $p < 0,05$ ) respect to the counts recorded in the first five days of study. At the sixth day, the counts decreased significantly ( $p < 0,05$ ) to 7,10 log cfu/g of sample, but remaining above the minimum recommended dose ( $10^6$  cfu/g) to receive the health benefits of these organisms.



**Figure 9.** Viability of bifidobacteria in infant formula and moisture during time of consumption (14 days).

\* Asterisks in the bars show significant differences ( $p < 0,05$ ) by bilateral separate means test in viability of bifidobacteria (log cfu/g) at days 2 to 14 with respect to 1<sup>st</sup> day

In the second study (Figure 9), initial counts of bifidobacteria were higher (7,88 log cfu/g of sample) than the previous study, and the counts remained with no significant differences ( $p < 0,05$ ) until the fourth day of study. The following days the counts were significantly ( $p < 0,05$ ) lower than those found in the four first days, decreasing down to 7,19 log cfu/g of sample in the last day of the study. As in the previous study, the count remained above the minimum recommended dose in the last day, being higher in this second study probably because initial counts also were higher than in the previous study (six days).

In both studies, the moisture of the samples was determined to check that if a decrease in the number of bifidobacteria was not due to an increase in the water content of the infant formula during the time which the can was opened. None of both studies showed an important increase in moisture content, ranged always between 2,70 and 3,33% for the longest investigation.

Another factor reported to affect the viability of bifidobacteria is the pH of the product containing the probiotic bacteria. Therefore, this parameter was measured in the samples used in the microbiological analyses in both studies. The pH of the product ranged between 7,06 in the first day to 6,74 in the fourteen day of study. These values are above those mentioned in other studies for affecting the viability of bifidobacteria in dairy products, specially in fermented milk.

To complete the experiment, we calculated the percentage of viability of bifidobacteria in both studies by relating the final count (6<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day) with the initial count (1<sup>st</sup> day) of each study. The results showed 32,19% of viability in the study of six days, and 25,55% in the study of fourteen days.

Many studies found in the scientific bibliography about viability of bifidobacteria in dairy products are reported to yogurts or fermented milk stored in refrigeration during various weeks. In some of these studies (Yaguchi, 1984; Reuter 1990; Hughes and Hoover, 1995) have been observed a more intensive loss of bacterial viability in fermented milk than in unfermented milk, remaining counts of bifidobacteria  $>10^6$  cfu/mL after 15 days of storage and after 28 days in the latter. In other works have been described a decrease in viability up to 82% of *B. infantis* in skim milk with at pH 4,3 (Lankaputhra *et al.*, 1996). In our study, viability of bifidobacteria remained above the recommended dose during fourteen days due milk pH never was under 6,74. Similar results were reported by Shin *et al.* (2000b) in two unfermented milk containing bifidobacteria and stored at 4 °C, with pH values of 6,6 or higher in both milks.

We used *B. bifidum* and *B. longum* as probiotic organisms based on the results obtained in the first experiment. In the present study the viability of bifidobacteria in a powder infant formula during fourteen days has been demonstrated. Although there are few studies comparing the capacity of different species of *Bifidobacterium* to remain viable in the products which are added, *B. bifidum* was slightly more stable than *B. breve* both in fermented and unfermented milk sold in Japan (Reuter, 1990). It have been also described to enhance viability of *B. bifidum* in skim fermented milk the supplementation with 5% SCFOS or GOS, showing 67,3 and 52,2% of viability, respectively, while the value was 11,6% in control milk (Shin *et al.* 2000a).

Although the percentage of viability of bifidobacteria found in our study was not enough high, it remained always above the recommended dose. This fact might be due to the advantages of the powdered infant formula respect to other dairy products, as well as its storage at room temperature, package in protect atmosphere, low moisture, pH stability and the use of material not permeable to oxygen for packing. An example of important loss of viability of bifidobacteria has been described when adding to yogurts packed in plastic containers comparing to those packed in glass bottles (Dave and Shah, 1997).

## **2. Composition of the faecal microflora in control or probiotic infant formula fed infants during the first year of life**

Once tested the viability of the bifidobacteria contained in the probiotic infant formula with counts above the recommended level ( $\geq 10^6$  cfu/g) during the fourteen days of consumption of the product, the next step was to evaluate the composition of faecal infant flora during the first year of life according to the diet composed by a probiotic infant formula (PIF). A group of infants were fed with PIF, while as control another group of infants was fed with the formula used as base for elaborating the PIF but with no bifidobacteria (control infant formula or CIF). Table 5 showed in Material and methods section (page 256), displays the infants feed schedule followed with the five babies studied.

The composition of the resident microflora in the infant gastrointestinal tract (GT) have been widely determined using standard culture techniques and phenotypic characterizations (based in colony morphology and determined biochemical markers such as enzymatic activities and final products of the metabolism). Nevertheless, these traditional culture methods only can show a part of the great microbial diversity present in the infant colon since they are only applicable to cultivable bacteria and frequently the media choose are not selective for the bacterial specie or genus required (Silvi *et al.*, 1996; Hartemink and Rombouts, 1999).

In the last years, molecular biology techniques are been used successfully to study the GT microflora. In prokaryotes the comparative analysis of ribosomic RNA (rRNA), especially of the genes 16S and 23S rRNA, have been used in the identification of bacteria from the level of genus to specie or strain (Langendijk *et al.*, 1995). In particular, the polymerase chain reaction (PCR) using the primers 16S rRNA have been applied successfully in the detection and quantification of predominant anaerobes in the faeces of infants and adults (Wang *et al.*, 1996), as well as the pursuit of *Bifidobacterium* as probiotic in faeces of instant infant formula fed infants containing this strain (Kok *et al.*, 1996b).

The present study was carried out with traditional culture techniques since the number of organisms to investigate was reduced, as well as the culture media used for plate counts are sufficiently accepted by the scientific bibliography as suitable for the bacteria investigated: total anaerobes, bacteroides, bifidobacteria and clostridia.

In **Table 13** is shown the one-way ANOVA of the microbiological counts and faecal pH of the two infants fed with CIF and the three fed with PIF during the first year of life. In all cases, the differences were statistically significant ( $p < 0,001$ ) due that feeding during the first year of life of infants affected significantly faecal counts, and this, consequently in the final values of faecal pH due to the organic acids production.

**Table 13.** One-way ANOVA for the number of microorganisms and pH of faeces in control or probiotic formula fed infants during the first year of life

|                        | Baby 1 | Baby 2 | Baby 3 | Baby 4 | Baby 5 |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Total anaerobes</b> | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>Bacteroides</b>     | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>Bifidobacterium</b> | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>Clostridium</b>     | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |
| <b>pH</b>              | ***    | ***    | ***    | ***    | ***    |

Statistical significance: \*\*\* $p < 0,001$

**Table 14** shows the counts, expressed as log cfu/g faeces, of total anaerobes, bacteroides, bifidobacteria and clostridia of the five infants during the first year of life. As it is recommended (ESPGAN, 1981), PIF was not administered until the age of four months. The two first counts showed lower bacteroides (except baby 5 in the first month) and clostridia (except in the third month) in PIF than in CIF fed infants, although all infants were fed with human milk or initial infant formula. The count of bifidobacteria in this period was very similar among all infants. In baby 1 the counts of bifidobacteria and clostridia remained without

changes along time, while count of bacteroides decreased significantly ( $p < 0,05$ ). The numbers of bacteroides and clostridia in baby 2, fed with CIF, did not show any clear trend throughout time. However, the count of bifidobacteria decreased significantly ( $p < 0,05$ ) with the age (from 7,12 log cfu/g at first month of age to 6,62 log cfu/g at first year of age). Among PIF fed infants, the count of bacteroides did not show significant ( $p < 0,05$ ) changes in baby 3 (from 6,71 log cfu/g at first month of age to 6,84 log cfu/g first year of age), increasing significantly ( $p < 0,05$ ) until the ninth month in baby 4 (7,35 log cfu/g) or seventh month in baby 5 (7,90 log cfu/g), and afterwards decreasing significantly ( $p < 0,05$ ). Regarding to clostridia, a significant ( $p < 0,05$ ) increase was produced in the seventh month in baby 1 (6,10 log cfu/g), in the twelfth month in baby 4 (7,68 log cfu/g), and decreased significantly ( $p < 0,05$ ) at the end in baby 5 (4,81 log cfu/g). Bifidobacteria showed a clear trend to decrease with the age in CIF fed babies. Among PIF fed infants, babies 3 and 4 increased the counts in the seventh month (6,94 and 8,14 log cfu/g, respectively), although in baby 4 bifidobacteria count decreased significantly ( $p < 0,05$ ) at the end of the study (6,12 log cfu/g). Baby 5 showed a significant ( $p < 0,05$ ) recovery of the number of bifidobacterias at fifth month (8,84 log cfu/g) but decreased (8,12 log cfu) significantly ( $p < 0,05$ ) at seventh month.

**Table 14.** Number of microorganisms in infant feces during the first year of life

| Type of formula<br>Microorganism | Age of babies (in months) |                          |                          |                          |                          |                          |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                  | 1                         | 3                        | 5                        | 7                        | 9                        | 12                       |
| <b>Control (baby 1)</b>          |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
| Total anaerobes                  | 7,76±0,043 <sup>ab</sup>  | 8,46±0,003 <sup>a</sup>  | 6,60±0,41 <sup>d</sup>   | 7,95±0,029 <sup>ab</sup> | 6,75±0,10 <sup>cd</sup>  | 7,48±0,00 <sup>bc</sup>  |
| <i>Bacteroides</i>               | 7,24±0,043 <sup>ab</sup>  | 7,36±0,052 <sup>a</sup>  | 7,16±0,046 <sup>bc</sup> | 7,17±0,035 <sup>bc</sup> | 7,05±0,02 <sup>c</sup>   | 6,45±0,017 <sup>d</sup>  |
| <i>Bifidobacterium</i>           | 7,25±0,043 <sup>a</sup>   | 5,83±0,17 <sup>bc</sup>  | 5,43±0,20 <sup>c</sup>   | 6,74±0,029 <sup>a</sup>  | 5,66±0,031 <sup>bc</sup> | 6,11±0,009 <sup>b</sup>  |
| <i>Clostridium</i>               | 6,44±0,22 <sup>ab</sup>   | 6,45±0,037 <sup>ab</sup> | 6,79±0,009 <sup>a</sup>  | 6,04±0,023 <sup>b</sup>  | 3,84±0,068 <sup>c</sup>  | 6,80±0,27 <sup>a</sup>   |
| <b>Control (baby 2)</b>          |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
| Total anaerobes                  | 9,12±0,026 <sup>a</sup>   | 8,77±0,0145 <sup>b</sup> | 8,77±0,043 <sup>b</sup>  | 7,58±0,137 <sup>c</sup>  | 7,48±0,00 <sup>c</sup>   | 7,01±0,038 <sup>d</sup>  |
| <i>Bacteroides</i>               | 6,91±0,433 <sup>ab</sup>  | 7,71±0,12 <sup>a</sup>   | 5,78±0,00 <sup>c</sup>   | 7,06±0,128 <sup>ab</sup> | 7,28±0,069 <sup>ab</sup> | 6,57±0,029 <sup>bc</sup> |
| <i>Bifidobacterium</i>           | 7,12±0,084 <sup>b</sup>   | 7,65±0,029 <sup>a</sup>  | 7,06±0,022 <sup>b</sup>  | 7,21±0,04 <sup>b</sup>   | 7,26±0,047 <sup>b</sup>  | 6,62±0,081 <sup>c</sup>  |
| <i>Clostridium</i>               | 6,72±0,014 <sup>a</sup>   | 3,48±0,00 <sup>d</sup>   | 6,63±0,182 <sup>a</sup>  | 6,21±0,023 <sup>b</sup>  | 5,19±0,032 <sup>c</sup>  | 5,86±0,049 <sup>b</sup>  |
| <b>Probiotic (baby 3)</b>        |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
| Total anaerobes                  | 8,47±0,087 <sup>a</sup>   | 6,94±0,121 <sup>bc</sup> | 7,19±0,12 <sup>bc</sup>  | 7,31±0,12 <sup>b</sup>   | 6,70±0,136 <sup>c</sup>  | 7,32±0,008 <sup>b</sup>  |
| <i>Bacteroides</i>               | 6,71±0,08 <sup>a</sup>    | 6,57±0,097 <sup>a</sup>  | 6,71±0,037 <sup>a</sup>  | 6,52±0,159 <sup>a</sup>  | 5,78±0,00 <sup>b</sup>   | 6,84±0,082 <sup>a</sup>  |
| <i>Bifidobacterium</i>           | 8,20±0,00 <sup>a</sup>    | 6,05±0,003 <sup>d</sup>  | 5,65±0,173 <sup>e</sup>  | 6,94±0,114 <sup>c</sup>  | 7,54±0,00 <sup>b</sup>   | 7,32±0,117 <sup>b</sup>  |
| <i>Clostridium</i>               | 5,94±0,227 <sup>a</sup>   | 5,40±0,046 <sup>bc</sup> | 5,37±0,032 <sup>c</sup>  | 6,10±0,003 <sup>a</sup>  | 5,93±0,012 <sup>a</sup>  | 5,87±0,072 <sup>ab</sup> |
| <b>Probiotic (baby 4)</b>        |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
| Total anaerobes                  | 7,64±0,45 <sup>ab</sup>   | 6,71±0,08 <sup>b</sup>   | 8,49±0,055 <sup>a</sup>  | 8,25±0,014 <sup>a</sup>  | 7,91±0,16 <sup>a</sup>   | 6,75±0,166 <sup>b</sup>  |
| <i>Bacteroides</i>               | 5,57±0,108 <sup>b</sup>   | 5,52±0,24 <sup>b</sup>   | 4,47±0,00 <sup>c</sup>   | 6,71±0,058 <sup>a</sup>  | 7,35±0,265 <sup>a</sup>  | 5,78±0,00 <sup>b</sup>   |
| <i>Bifidobacterium</i>           | 8,82±0,133 <sup>a</sup>   | 7,65±0,323 <sup>b</sup>  | 7,58±0,108 <sup>b</sup>  | 8,14±0,057 <sup>ab</sup> | 8,14±0,185 <sup>ab</sup> | 6,12±0,2 <sup>c</sup>    |
| <i>Clostridium</i>               | 4,60±0,075 <sup>d</sup>   | 5,37±0,127 <sup>cd</sup> | 6,05±0,061 <sup>bc</sup> | 6,14±0,17 <sup>bc</sup>  | 6,41±0,18 <sup>b</sup>   | 7,68±0,067 <sup>a</sup>  |
| <b>Probiotic (baby 5)</b>        |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
| Total anaerobes                  | 7,91±0,274 <sup>bc</sup>  | 7,64±0,142 <sup>bc</sup> | 8,86±0,075 <sup>a</sup>  | 8,22±0,081 <sup>ab</sup> | 8,20±0,091 <sup>ab</sup> | 7,36±0,096 <sup>c</sup>  |
| <i>Bacteroides</i>               | 7,51±0,23 <sup>ab</sup>   | 5,12±0,026 <sup>c</sup>  | 7,90±0,029 <sup>a</sup>  | 7,90±0,029 <sup>a</sup>  | 7,40±0,00 <sup>b</sup>   | 7,28±0,058 <sup>b</sup>  |
| <i>Bifidobacterium</i>           | 7,85±0,267 <sup>bc</sup>  | 6,76±0,017 <sup>d</sup>  | 8,84±0,026 <sup>a</sup>  | 8,12±0,064 <sup>b</sup>  | 7,85±0,13 <sup>bc</sup>  | 7,38±0,05 <sup>c</sup>   |
| <i>Clostridium</i>               | 5,03±0,156 <sup>abc</sup> | 5,47±0,023 <sup>a</sup>  | 5,24±0,043 <sup>ab</sup> | 4,71±0,037 <sup>c</sup>  | 5,35±0,15 <sup>a</sup>   | 4,81±0,11 <sup>bc</sup>  |

Values are mean log cfu /g of wet feces±SE, n=3

<sup>a-e</sup> Means with unlike superscript letter in the same row for each baby are significantly different by Tukey's test ( $p < 0,001$ )

In summary, Table 33 data showed no homogeneity in bacteroides and clostridia counts in all babies. With regard to bifidobacteria numbers, it decreased in fed CIF infants with age,

but a recovery was observed after PIF administration although their counts decreased at the end of the study.

The counts obtained from the different organisms at first and third month of life agree with those found in other studies with infant formula fed infants (Lundequist *et al.*, 1985; Kleessen *et al.*, 1995) or human milk fed infants (Lundequist *et al.*, 1985; Kleessen *et al.*, 1995; Orrhage and Nord, 1999). There are very few studies of the infant flora composition further than five months of age. Clostridia counts have been reported to range from 4 to 5,5 and 5,8 log cfu/g of faeces in human milk fed infants at six and twelve months of age, respectively (Orrhage and Nord, (1999). These counts are in agreement with our results, as well as those obtained with bacteroides and bifidobacteria at the first year of life (7 and 7,3 log cfu/g, respectively).

**Table 15** shows pH values measured in the faecal samples of the five babies of the study. The general trend was an increase of faecal pH through the age of infants. In fact, four of the five infants (babies 1, 2, 4 and 5) showed the highest value of pH in the sample corresponding to the first year of life. The lowest pH values were showed during the first three months of age in all babies except in baby 4.

Some studies have reported that breast-fed infants faeces have a lower pH than bottle-fed infant faeces (Balmer *et al.*, 1989; Kleessen *et al.*, 1995; Langhendries *et al.*, 1995). The high lactose content and the low protein and phosphates contents in human milk have been suggested as bifidogenic factors (Yoshioka *et al.*, 1983). Moreover, the low buffer capacity of human milk favours bifidobacteria growth since lactose fermentation keep intestinal acidity by acetic and lactic acids (Yoshioka *et al.*, 1983). In our study, babies 1 and 5 showed a significantly ( $p < 0,001$ ) more reduced pH in the first sample due both were fed only with human milk during the first month. Langhendries *et al.* (1995) also found at first month of life that human milk fed infants showed a significantly ( $p < 0,05$ ) lower pH (5,07) than whey-adapted infant formula fed infants (5,52), but no differences were found with faeces pH of formula containing *B. bifidum* fed infants (5,30), being bifidobacteria the predominant anaerobe flora in both breast-fed and probiotic formula fed infants. Kleessen *et al.* (1995) described pH values more similar to ours in a group of infants fed with human milk or whey based infant formula at first month (6,22 and 6,99, respectively) and third month (5,82 and 7,22, respectively) of age.

**Table 15.** pH values of infant faeces during the first year of life

| Type of formula           | Age of babies (in months) |                         |                         |                         |                         |                         |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                           | 1                         | 3                       | 5                       | 7                       | 9                       | 12                      |
| <b>Control (baby 1)</b>   | 5,48±0,07 <sup>e</sup>    | 7,07±0,05 <sup>b</sup>  | 6,39±0,03 <sup>d</sup>  | 6,78±0,01 <sup>c</sup>  | 7,00±0,01 <sup>b</sup>  | 7,40±0,009 <sup>a</sup> |
| <b>Control (baby 2)</b>   | 6,43±0,07 <sup>d</sup>    | 6,23±0,01 <sup>e</sup>  | 6,93±0,02 <sup>c</sup>  | 7,28±0,02 <sup>b</sup>  | 7,49±0,03 <sup>a</sup>  | 7,58±0,01 <sup>a</sup>  |
| <b>Probiotic (baby 3)</b> | 6,96±0,03 <sup>d</sup>    | 7,15±0,01 <sup>c</sup>  | 6,34±0,03 <sup>e</sup>  | 7,87±0,01 <sup>a</sup>  | 7,72±0,01 <sup>b</sup>  | 7,21±0,02 <sup>c</sup>  |
| <b>Probiotic (baby 4)</b> | 6,71±0,006 <sup>b</sup>   | 5,98±0,003 <sup>d</sup> | 6,72±0,007 <sup>b</sup> | 6,39±0,006 <sup>c</sup> | 5,72±0,003 <sup>e</sup> | 7,64±0,006 <sup>a</sup> |
| <b>Probiotic (baby 5)</b> | 5,58±0,05 <sup>e</sup>    | 7,18±0,005 <sup>b</sup> | 6,92±0,02 <sup>c</sup>  | 6,28±0,009 <sup>d</sup> | 7,18±0,01 <sup>b</sup>  | 8,02±0,009 <sup>a</sup> |

Values are mean±SE, n=3

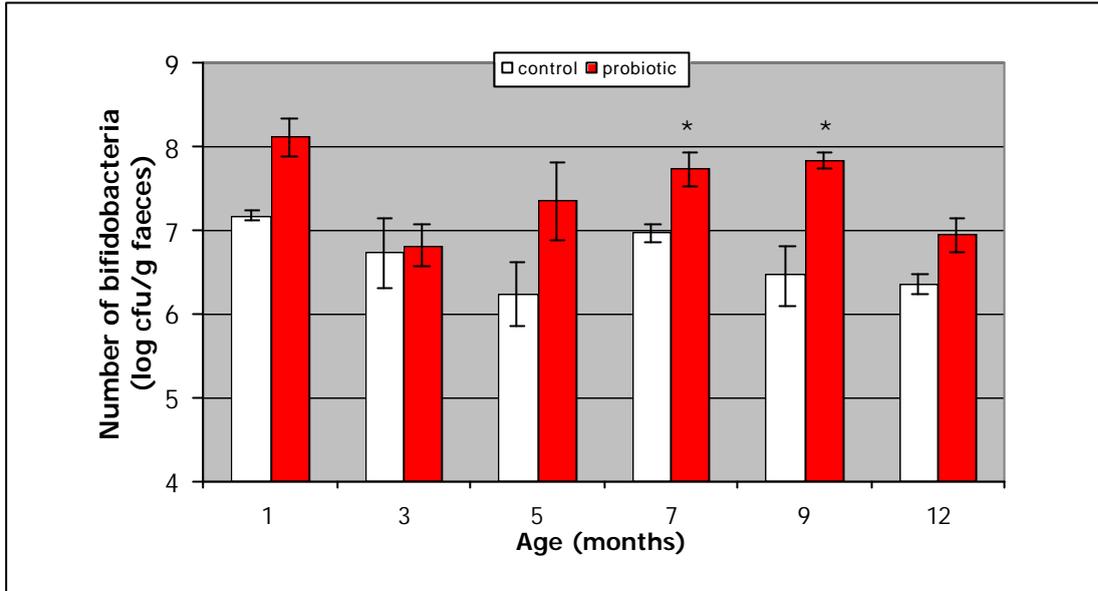
<sup>a-e</sup> Means with unlike superscript letter in the same row are significantly different by Tukey's test ( $p < 0,001$ )

In **Table 16** is shown the one-way ANOVA of the microbiological counts found in CIF (babies 1 and 2) and PIF (babies 3, 4 and 5) fed babies during the first year of life. Bacterial counts displayed a great variability until third month due possibly that infant colonization is influenced by some factors such as intestinal and vaginal mother's flora, type of delivery (vaginal or caesarian) and type of lactation (breast or bottle-feeding) (Lundequist *et al.*, 1985). With regard to the type of delivery, specially important are the environmental conditions in maternity rooms and hygiene of medical and nursery staff's hands during delivery (Lundequist *et al.*, 1985; Grönlund *et al.*, 1999). From the fifth month only significant differences ( $p < 0,001$ ) in clostridia counts were detected. This fact coincides with the beginning of PIF and complementary feeding that makes similar the microbiological profile between breast-fed or bottle-fed infants (Stark and Lee, 1982). Therefore, total anaerobes, bacteriodes and clostridia counts remain with no differences (except at ninth month) between both groups until the first year of age. At seventh and ninth month of age differences between PIF fed or CIF fed infant groups in bifidobacteria counts are exhibited. This difference is showed in **Figure 10** where bifidobacteria count at seventh and ninth month was significantly ( $p < 0,05$ ) higher in PIF fed group. Also a significant ( $p < 0,01$ ) higher number of bifidobacteria at first month of age in PIF fed group was observed due to the effect of mother milk at this age. Finally, **Table 16** shows the similarity in all bacteriological counts in PIF fed or CIF fed infant groups at first year of life, possibly due to the great diversity of food that infant had at this age, and because the amount of PIF fed was reduced comparing to the other foods, might develop a intestinal flora with a wider bacterial species (Stark and Lee, 1982).

**Table 16.** One-way ANOVA for the number of microorganisms of faeces between control or probiotic formula fed infants during the first year of life

| Bacteria               | Age of babies (in months) |     |     |    |     |    |
|------------------------|---------------------------|-----|-----|----|-----|----|
|                        | 1                         | 3   | 5   | 7  | 9   | 12 |
| <b>Total anaerobes</b> | NS                        | *** | NS  | NS | NS  | NS |
| <b>Bacteroides</b>     | NS                        | *** | NS  | NS | NS  | NS |
| <b>Bifidobacterium</b> | **                        | NS  | NS  | *  | *** | NS |
| <b>Clostridium</b>     | ***                       | NS  | *** | NS | *** | NS |

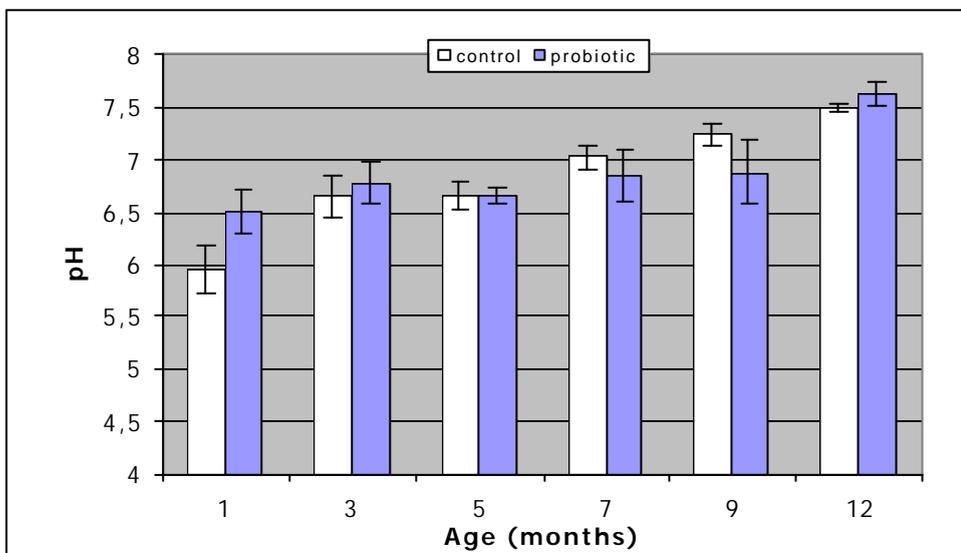
Statistical significance: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; NS=not significant



**Figure 10.** Number of bifidobacteria in feces of infant fed control or probiotic formula during the first year of life

\* Asterisks in the bars show significant differences ( $p < 0,05$ ) by bilateral separate means test in viability of bifidobacteria (log cfu/g) at months 3 to 12 between both groups

**Figure 11** shows pH values of faecal samples of PIF fed and CIF fed groups. Previously have been described that various studies reported a lower pH in breast-fed infants and probiotic infant formula-fed infants than infant formula-fed infants (Langhendries *et al.*, 1995). As it is shown in Figure 11, pH faecal samples in our study did not display significant differences ( $p < 0,05$ ) at any age. However, at seventh and ninth month of age pH values were lower in PIF fed group than those in CIF group, moreover bifidobacteria count in the same group at these ages was significantly ( $p < 0,05$ ) higher than CIF fed group.



**Figure 11.** pH in faeces of infant fed control or probiotic formula during the first year of life

The colonies grown in Raffinose Bifidobacterium (RB) medium were gram positive stained and showed with pleomorphic morphology under optical microscope. These colonies were afterwards isolated and incubated for carbohydrate fermentation pattern using the enzymatic test API 50CHL which is shown in **Table 17**. In all samples the carbohydrate fermentation pattern was very similar, therefore we cannot affirm that probiotic bacteria affects faecal bifidobacteria. Moreover, almost all colonies were not able to ferment raffinose, which it was the carbon source used in RB medium. Moreno *et al.* (2000) neither found the enzymatic test API 50CHL as reproducible at 100% for the identification of bifidobacteria in dairy products, although other researchers consider suitable this enzymatic test (Shin *et al.*, 2000b).

It might be concluded that *B. bifidum* and *B. longum* used as probiotics in infant formula showed counts above  $10^6$  cfu/g during the fourteen days of consumption of the product. However, when the PIF was administered to infants from the fourth to the twelfth month of age, only bifidobacteria count was significantly ( $p < 0,05$ ) higher than CIF fed group at seventh and ninth month. At fifth month there were not differences probably because it was very soon to see any effect, and at twelfth month because the ratio of the PIF to the total feeding at this age was very lack. Moreover, the carbohydrate fermentation pattern (api 50 CHL) showed by faecal bifidobacteria did not show any change in its composition after PIF feeding.



**Table 17.** Pattern of fermentation of bifidobacteria isolated in the infant faecal samples using the api 50CH kit. Results are shown by baby (1, 2, 3, 4 and 5) and period of sampling (1, 3, 5, 7, 9 and 12).

### 3<sup>rd</sup> STUDY

#### ***In vivo* study of the effect of follow-up infant formulas containing probiotics, prebiotics and synbiotics on mineral absorption in rats**

Studies in babies are very limited because of ethical and methodological reasons, for these motives *in vitro* tests, which mimic physiological conditions of the organism purpose of the study are very useful. One alternative are *in vivo* studies using pup rats as a animal infant model for the evaluation of mineral availability in infant formula (Lönnerdal *et al.*, 1993, 1994). In the present work, animals were separated from their dams at three weeks old because they are already feeding on milk and are a better model than adult rats. Sarriá *et al.* (2001) reported that it is reasonable to use pup rats with a milk diet and presumably have a gastrointestinal physiology more similar to that of human infants.

#### **1. Effect on physiological measurements and growth ratio of rats**

**Table 18** shows the one-way ANOVA of the parameters measured in rats to evaluate the growth of the animals, such as final body weight, weight gain, food intake and food efficiency which were all of them affected by the consumption of the different diets.

**Table 18.** Effect of initial body weight on the variation of final body weight, weight gain, food intake and food efficiency due to the diets subjected of the study, and study of the effect of initial body weight on the variation of these parameters

|                          | ANOVA | MANCOVA<br>co-variable: initial body weight |
|--------------------------|-------|---|
| <b>Final body weight</b> | ***   | ***   |
| <b>Weight gain</b>       | ***   | NS  |
| <b>Food intake</b>       | ***   | **  |
| <b>Food efficiency</b>   | ***   | NS  |

Statistical significance: \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; NS=not significance

Although results obtained from the first group (fed with AO4 diet) are showed, for discussing the results and statistical analysis of the data we did not use them. This group was used as a reference to monitor the growth of the rest of groups fed with infant formulas.

In **Table 19** are shown the parameters related with the growth and feed efficiency of the rats fed nine experimental diets. Initial body weight was significantly different ( $p<0,05$ ) among the nine groups. The groups with higher initial weight were those fed AO4 and control diets (89,37 and 72,67 g, respectively), ranging for the rest groups between 36,32 and 55,93 g (groups fed synbiotic 1,2 and 10% diets, respectively). At the end of the study groups fed AO4 and control diets displayed also the higher final body weights (321,77 and 217,40 g, respectively), while group fed synbiotic 1,2% diet showed the lower final weight (81, 30 g). Weight gain and food intake parameters were significantly ( $p<0,05$ ) higher in group fed AO4

diet (232,40 and 695,12 g, respectively) comparing with groups fed control and problem diets (probiotic, prebiotics and synbiotics diets). The only group with no differences respect to control group (144,73 and 298,53 g, respectively) was that fed prebiotic 5% diet (130,08 and 262,98 g, respectively), and again the groups with the significant ( $p < 0,05$ ) lower values were those fed synbiotic 1,2% (81,30 and 175,21 g, respectively) and 5% diets (90,77 and 206,28 g, respectively).

Using weight gain and total food intake values during 30 days of study, we calculated food efficiency to evidence a possible less profit of the food in the groups with lower initial body weight. However, all groups fed infant formula showed a higher feed efficiency ( $\geq 0,44$ ) than first group (0,33). This fact indicates that no group fed infant formula suffered a delay in growing or nutritional need during the study, moreover this manifest that protein quality of diets containing infant formula was higher than in AO4 diet.

**Table 19.** Body weight and food intake of rats administered the diets for 30 days

| Diets                 | Initial body weight (g) | Final body weight (g)     | Weight gain (g)            | Food intake (g)            | Food efficiency         |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <b>AO4</b>            | 89,37±0,54 <sup>a</sup> | 321,77±7,27 <sup>a</sup>  | 232,40±7,09 <sup>a</sup>   | 695,12±12,04 <sup>a</sup>  | 0,33±0,01 <sup>c</sup>  |
| <b>Control</b>        | 72,67±2,50 <sup>b</sup> | 217,40±8,44 <sup>b</sup>  | 144,73±6,35 <sup>b</sup>   | 298,53±12,70 <sup>b</sup>  | 0,48±0,01 <sup>ab</sup> |
| <b>Probiotic</b>      | 42,68±0,83 <sup>d</sup> | 154,88±2,53 <sup>de</sup> | 112,20±2,15 <sup>ce</sup>  | 223,36±6,46 <sup>d</sup>   | 0,50±0,02 <sup>a</sup>  |
| <b>Prebiotic 1,2%</b> | 42,77±1,22 <sup>d</sup> | 164,17±3,38 <sup>ce</sup> | 121,40±2,67 <sup>cd</sup>  | 239,29±5,48 <sup>cd</sup>  | 0,51±0,01 <sup>a</sup>  |
| <b>Prebiotic 5%</b>   | 52,02±0,63 <sup>c</sup> | 182,10±2,72 <sup>c</sup>  | 130,08±2,49 <sup>bc</sup>  | 262,98±2,99 <sup>bc</sup>  | 0,49±0,01 <sup>a</sup>  |
| <b>Prebiotic 10%</b>  | 55,73±0,52 <sup>c</sup> | 176,05±4,12 <sup>cd</sup> | 120,32±4,11 <sup>cd</sup>  | 255,62±5,20 <sup>cd</sup>  | 0,47±0,01 <sup>ab</sup> |
| <b>Synbiotic 1,2%</b> | 36,32±2,57 <sup>e</sup> | 117,62±5,23 <sup>f</sup>  | 81,30±4,75 <sup>g</sup>    | 175,21±6,25 <sup>f</sup>   | 0,46±0,01 <sup>ab</sup> |
| <b>Synbiotic 5%</b>   | 51,93±0,36 <sup>c</sup> | 142,70±3,57 <sup>e</sup>  | 90,77±3,54 <sup>fg</sup>   | 206,28±7,67 <sup>ef</sup>  | 0,44±0,01 <sup>b</sup>  |
| <b>Synbiotic 10%</b>  | 55,93±0,99 <sup>c</sup> | 165,08±4,76 <sup>ce</sup> | 109,15±4,50 <sup>def</sup> | 234,15±8,29 <sup>cde</sup> | 0,46±0,01 <sup>ab</sup> |

Values are mean±SE, n=6

<sup>a-g</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test ( $p < 0,05$ )

To validate the results obtained and to achieve trustworthy conclusions when comparing the results of the different groups, a multivariate co-variance was developed using initial body weight as co-variable because the study started with groups showing different weights. This study is shown in Table 18, and were not differences for weight gain and food efficiency when initial body weight was used as co-variable. Therefore, the influence of this parameter on the others is controlled.

Food efficiency values found in our study are similar to those showed in other studies (food efficiency of 44) carried out in rats four-five weeks old fed diets supplemented with 5 and 10% GOS during ten and seven days (Chonan and Watanuki, 1995; Chonan and Takahashi, 1999).

**Table 20** shows the physiological measurements of animals during the three periods of mineral balance. In the previous table could be observed that the two problem groups with higher initial weight were those fed prebiotic and synbiotic 5 and 10% (from 51,93 to 55,93 g). However, Table 20 displays that in the first period (8-10 days), group fed synbiotic 5% showed a significant ( $p < 0,05$ ) lower weight (74,93 g) if compared with the other three groups (fed prebiotics 5 and 10% and synbiotic 10%). In the second (18-20 days) and third periods (28-30

days) the groups with the higher body weight were those fed prebiotic 5 and 10% diets (121,65 and 118,47 g; 177,09 and 170,78 g, respectively). On the other hand, until the end of the study the group fed synbiotic 1,2% diet showed the lowest body weight (from 36,32 g to 113,57 g).

Regarding to food intake, in the first period, except the group fed synbiotic 1,2% diet (4,67 g/day), no group displayed significant differences ( $p < 0,05$ ) with control group (6,05 g/day). In the second period, all group exhibited a significantly ( $p < 0,05$ ) lower food intake respect to control group (10,42 g/day). In the third period, only groups fed prebiotic 5 and 10% diets (12,59 and 12,73 g/day, respectively) did not show differences to control group (13,07 g/day).

The consumption of 4'-GOS is affected by the food intake. Thus, groups fed prebiotic and synbiotic diets at 1,2 and 5% concentrations, 4'-GOS intake was lower in groups fed synbiotic diets than in those fed prebiotic diets, since to the lower food intake in the rats fed synbiotic diets. However, groups fed prebiotic and synbiotic 10% diets showed the same 4'-GOS intake during the three periods.

In general groups fed prebiotic and synbiotic 10% diets showed the higher water intake and urine excretion among the problem groups in the three periods of the study.

The faecal volume (expressed as fresh weight) in rats fed AO4 diet was higher in the three periods (twelve, eight and six times higher, respectively) in regard to those fed infant formula diets. Moreover, during the three periods of mineral balance no group fed problem diets showed a significant ( $p < 0,05$ ) higher faecal volume than group fed control diet.

Finally, Table 20 shows the moisture of the faecal samples. The water content in faeces of groups fed problem diets in all periods presented no significant differences or was significantly ( $p < 0,05$ ) lower than in faeces of group fed control diet, except in the second period where faecal humidity of group fed probiotic diet was significantly ( $p < 0,05$ ) higher (47,78%) than in control group (43,48%).

A known effect of insoluble fiber diet and certain NDO is to increase faecal volume (Cummings *et al.* 1992; Gibson *et al.*, 1995; Roberfroid *et al.*, 1993). However, we did not observed this effect when 4'-GOS were added to the diet. Different studies neither found significant differences ( $p < 0,05$ ) in dry weight of faeces of rats fed diet containing 5% 4'-GOS respect to control group during seven days (Chonan *et al.*, 2001), containing 5% SCFOS, nystose, inulin and guar gum during six weeks (Tashiro *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1994b). In our work infant formula, without fiber in its composition, used as base for adding 4'-GOS possibly might be the reason in the differences of faecal weight found between groups fed problem or AO4 diet. The latter diet showed in its composition a 18,5% of fiber content (Table 8 in Material and methods section).

## 2. Haematological and biochemical parameters in rats

To complete the evaluation of the physiological status of the animals some haematological and biochemical parameters were determined. In **Table 21** are shown the values obtained for hemoglobin (Hb), total red cells (TRC), hematocrit (Ht), serum Fe, TIBC (total iron binding capacity), serum albumin and urea, and blood lipid parameters such as total cholesterol (total COL), very low density lipoproteins (VLDL), high density lipoproteins (HDL) and triacylglycerols (TG).

Table 20. Physiological parameters in rats

| Period  | Diets          | Body weight (g)             | Food intake (g/d)           | 4'-GOS intake (g/d)      | Water intake (mL/d)        | Urine excretion (mL/d)    | Feces wet weight (g/d)   | Feces moisture (%)         |
|---------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0 days  | AO4            | 146,05±2,45                 | 20,29±0,74                  | 0,00±0,00                | 22,28±0,80                 | 4,50±0,35                 | 8,81±0,33                | 53,54±1,09                 |
|         | Control        | 102,32±2,62                 | 6,05±0,46                   | 0,00±0,00                | 9,83±0,50                  | 3,23±0,20                 | 0,69±0,14                | 47,42±0,89                 |
|         | Probiotic      | 70,05±1,11 <sup>*/c</sup>   | 5,85±0,13 <sup>b</sup>      | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 10,06±0,37 <sup>ab</sup>   | 1,96±0,10 <sup>*/b</sup>  | 0,47±0,12 <sup>a</sup>   | 40,35±0,19 <sup>*/b</sup>  |
|         | Prebiotic 1,2% | 72,98±1,33 <sup>*/c</sup>   | 5,87±0,27 <sup>b</sup>      | 0,07±0,00 <sup>*/d</sup> | 11,06±0,71 <sup>a</sup>    | 3,85±0,26 <sup>a</sup>    | 0,70±0,09 <sup>a</sup>   | 47,64±1,04 <sup>a</sup>    |
|         | Prebiotic 5%   | 83,65±0,89 <sup>*/a</sup>   | 6,87±0,15 <sup>a</sup>      | 0,34±0,01 <sup>*/b</sup> | 11,86±0,44 <sup>a</sup>    | 3,18±0,18 <sup>a</sup>    | 0,50±0,09 <sup>a</sup>   | 40,04±0,92 <sup>*/b</sup>  |
|         | Prebiotic 10%  | 83,98±1,10 <sup>*/a</sup>   | 5,91±0,23 <sup>b</sup>      | 0,59±0,02 <sup>*/a</sup> | 11,53±0,49 <sup>*/a</sup>  | 3,80±0,23 <sup>a</sup>    | 0,44±0,08 <sup>a</sup>   | 33,58±0,81 <sup>*/c</sup>  |
|         | Synbiotic 1,2% | 55,84±1,81 <sup>*/d</sup>   | 4,67±0,19 <sup>*/c</sup>    | 0,06±0,00 <sup>*/e</sup> | 8,22±0,27 <sup>b</sup>     | 1,29±0,09 <sup>*/c</sup>  | 0,22±0,04 <sup>*/a</sup> | 20,42±0,17 <sup>*/e</sup>  |
|         | Synbiotic 5%   | 74,93±1,11 <sup>*/c</sup>   | 5,26±0,32 <sup>bc</sup>     | 0,26±0,01 <sup>*/c</sup> | 8,89±0,43 <sup>b</sup>     | 1,46±0,12 <sup>*/bc</sup> | 0,36±0,09 <sup>a</sup>   | 24,03±0,25 <sup>*/d</sup>  |
|         | Synbiotic 10%  | 80,90±1,18 <sup>*/ab</sup>  | 5,87±0,16 <sup>b</sup>      | 0,59±0,01 <sup>*/a</sup> | 12,03±0,63 <sup>*/a</sup>  | 3,46±0,36 <sup>a</sup>    | 0,34±0,09 <sup>a</sup>   | 25,96±0,69 <sup>*/d</sup>  |
| 20 days | AO4            | 233,19±3,17                 | 25,66±0,35                  | 0,00±0,00                | 26,50±1,24                 | 7,13±0,29                 | 11,40±0,31               | 59,23±0,17                 |
|         | Control        | 148,11±3,66                 | 10,42±0,40                  | 0,00±0,00                | 13,33±0,55                 | 3,32±0,17                 | 1,32±0,11                | 43,48±1,68                 |
|         | Probiotic      | 105,03±1,01 <sup>*/de</sup> | 7,72±0,36 <sup>*/bc</sup>   | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 11,00±0,31 <sup>*/b</sup>  | 2,38±0,12 <sup>*/b</sup>  | 0,85±0,12 <sup>*/a</sup> | 47,78±1,10 <sup>*/a</sup>  |
|         | Prebiotic 1,2% | 109,37±1,31 <sup>*/cd</sup> | 8,50±0,19 <sup>*/ab</sup>   | 0,10±0,00 <sup>*/d</sup> | 10,83±0,53 <sup>*/bc</sup> | 2,16±0,12 <sup>*/b</sup>  | 0,51±0,06 <sup>*/a</sup> | 35,10±2,06 <sup>bc</sup>   |
|         | Prebiotic 5%   | 121,65±1,28 <sup>*/a</sup>  | 8,81±0,31 <sup>*/ab</sup>   | 0,44±0,01 <sup>*/b</sup> | 11,33±0,37 <sup>*/b</sup>  | 2,32±0,08 <sup>*/b</sup>  | 0,74±0,08 <sup>*/a</sup> | 41,74±1,02 <sup>b</sup>    |
|         | Prebiotic 10%  | 118,47±1,65 <sup>*/ab</sup> | 8,92±0,33 <sup>*/a</sup>    | 0,89±0,03 <sup>*/a</sup> | 11,72±0,71 <sup>b</sup>    | 3,44±0,23 <sup>a</sup>    | 0,45±0,09 <sup>*/a</sup> | 30,45±0,91 <sup>*/c</sup>  |
|         | Synbiotic 1,2% | 79,06±2,26 <sup>*/f</sup>   | 6,22±0,18 <sup>*/d</sup>    | 0,07±0,00 <sup>*/e</sup> | 8,94±0,37 <sup>*/c</sup>   | 1,06±0,12 <sup>*/c</sup>  | 0,55±0,10 <sup>*/a</sup> | 33,64±2,69 <sup>*/bc</sup> |
|         | Synbiotic 5%   | 100,27±1,23 <sup>*/e</sup>  | 7,01±0,21 <sup>*/cd</sup>   | 0,35±0,01 <sup>*/c</sup> | 9,72±0,36 <sup>*/bc</sup>  | 1,28±0,13 <sup>*/c</sup>  | 0,71±0,14 <sup>*/a</sup> | 37,06±1,57 <sup>*/b</sup>  |
|         | Synbiotic 10%  | 114,91±1,87 <sup>*/bc</sup> | 8,76±0,33 <sup>*/ab</sup>   | 0,87±0,03 <sup>*/a</sup> | 14,41±0,54 <sup>a</sup>    | 3,66±0,29 <sup>a</sup>    | 0,67±0,08 <sup>*/a</sup> | 39,38±1,89 <sup>b</sup>    |
| 30 days | AO4            | 317,29±3,94                 | 27,92±0,77                  | 0,00±0,00                | 31,78±1,73                 | 8,45±0,42                 | 11,97±0,63               | 54,54±0,12                 |
|         | Control        | 209,87±4,50                 | 13,07±0,48                  | 0,00±0,00                | 15,89±0,95                 | 5,31±0,47                 | 1,96±0,13                | 50,33±1,50                 |
|         | Probiotic      | 150,50±1,34 <sup>*/c</sup>  | 10,43±0,65 <sup>*/c</sup>   | 0,00±0,00 <sup>f</sup>   | 14,67±0,50 <sup>a</sup>    | 2,89±0,20 <sup>*/bc</sup> | 1,59±0,23 <sup>a</sup>   | 52,38±2,15 <sup>ac</sup>   |
|         | Prebiotic 1,2% | 159,04±2,03 <sup>*/bc</sup> | 11,00±0,43 <sup>*/abc</sup> | 0,13±0,01 <sup>*/d</sup> | 13,83±0,93 <sup>abc</sup>  | 3,60±0,23 <sup>*/ab</sup> | 1,31±0,21 <sup>a</sup>   | 57,70±1,24 <sup>a</sup>    |
|         | Prebiotic 5%   | 177,09±1,77 <sup>*/a</sup>  | 12,59±0,25 <sup>ab</sup>    | 0,63±0,01 <sup>*/b</sup> | 15,89±0,35 <sup>a</sup>    | 3,41±0,19 <sup>*/ab</sup> | 1,39±0,13 <sup>a</sup>   | 44,29±1,79 <sup>cd</sup>   |
|         | Prebiotic 10%  | 170,78±2,24 <sup>*/a</sup>  | 12,73±0,30 <sup>a</sup>     | 1,27±0,03 <sup>*/a</sup> | 15,50±0,50 <sup>a</sup>    | 4,06±0,27 <sup>*/a</sup>  | 0,99±0,16 <sup>*/a</sup> | 38,16±2,03 <sup>*/d</sup>  |
|         | Synbiotic 1,2% | 113,57±2,82 <sup>*/e</sup>  | 8,11±0,29 <sup>*/d</sup>    | 0,09±0,00 <sup>*/e</sup> | 11,00±0,63 <sup>*/c</sup>  | 2,09±0,12 <sup>*/c</sup>  | 1,10±0,11 <sup>*/a</sup> | 46,62±2,35 <sup>bcd</sup>  |
|         | Synbiotic 5%   | 139,66±2,16 <sup>*/d</sup>  | 10,23±0,46 <sup>*/c</sup>   | 0,51±0,02 <sup>*/c</sup> | 12,44±0,34 <sup>*/bc</sup> | 2,83±0,34 <sup>*/bc</sup> | 1,71±0,26 <sup>a</sup>   | 48,52±2,75 <sup>abcd</sup> |
|         | Synbiotic 10%  | 160,76±2,60 <sup>*/b</sup>  | 10,73±0,52 <sup>*/bc</sup>  | 1,07±0,05 <sup>*/a</sup> | 13,97±0,51 <sup>ab</sup>   | 4,18±0,29 <sup>*/a</sup>  | 1,90±0,23 <sup>a</sup>   | 53,06±1,81 <sup>ab</sup>   |

Values are mean±SE, n=6

Superscript letters within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group for each period

Diets with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets for each period

It can be observed that Hb, TRC and Ht in groups fed infant formula did not show significant differences (p<0,05) with respect to group fed reference diet (AO4). Biochemical parameters except in group fed prebiotic 10% diet for serum iron (438,75 µg/dL) and fed synbiotic 1,2% diet for albumin (2,37 µg/dL), no significant differences showed among groups fed probiotic and control diets.

With regard to total COL, all groups fed infant formula but those fed with probiotic diet, showed slightly lower values than control group, and in group fed prebiotic 1,2% diet (65,23 mg/dL) this difference was statistically significant ( $p < 0,05$ ). VLDL and HDL values were lower and higher, respectively in groups fed infant formula but without significant differences respect to group fed control diet. TG values showed a clear and significant ( $p < 0,05$ ) reduction in all problem groups (from 49,83 mg/dL with synbiotic 10% diet to 75,63 mg/dL with probiotic diet) with respect to control group (97,25 mg/dL).

Thus, in our work the addition of bifidobacteria and/or 4'-GOS during 30 days reduced significantly ( $p < 0,05$ ) TG blood levels. These results agree with those reported by other authors (Hata *et al.*, 1983; Tokunaga *et al.*, 1986) who used oligofructose at 5, 10 and 20%, and observed a significant decrease in TG values, although, and as well as in our study, COL levels were not always reduced. More recently, Kok *et al.* (1998b) showed that the postprandial increase in TG induced by high fat diet decreased after oligofructose administration in rats.

### 3. Enumeration of total bacteria and bifidobacteria in faeces of rats

**Table 22** displays the counts, expressed as log cfu/g faeces, of total aerobe and anaerobe bacteria and bifidobacteria found in rats during the three periods of mineral balance. No group fed infant formula showed higher counts of total aerobe in the third period than group fed control diet. In total anaerobe count, a significant ( $p < 0,05$ ) lower number was observed in group fed prebiotic 1,2% (6,40 log cfu/g faeces), prebiotic and synbiotic 10% diets (6,82 and 6,97 log cfu/g faeces, respectively) and prebiotic 10% and synbiotic diets (from 7,17 log cfu/g faeces in synbiotic 5% diet to 7,85 log cfu/g faeces in prebiotic 10% diet) than group fed control diet in the first, second and third periods, respectively. Regarding to bifidobacteria count, in the first period only group fed synbiotic 10% diet showed a significant ( $p < 0,05$ ) higher count (7,37 log cfu/g faeces) than control group (6,84 log cfu/g faeces). Moreover, the only groups with higher numbers (above 7 log cfu/g faeces) were those fed diets containing bifidobacteria (probiotic and synbiotics diets).

In the second period, generally all counts decreased, showing significantly ( $p < 0,05$ ) higher values in groups fed synbiotic diets (6,26, 7,08 and 6,61 log cfu/g faeces, respectively) than in control group (5,62 log cfu/g faeces). These data suggest that while total anaerobe count remain stable in these three groups, 4'-GOS was preferably used by bifidobacteria, increasing its number respect to other species in the large intestine. However, in the third period all groups increased slightly their counts but no differences with control group (6,35 log cfu/g faeces) were found except in group fed prebiotic 1,2% diet (7,07 log cfu/g faeces).

**Table 21.** Values for the haematological and biochemical parameters of the rats fed with different diets for 30 days

| Diets/Parameters <sup>j</sup>                | AO4                     | Control                 | Probiotic                 | Prebiotic 1,2%             | Prebiotic 5%               | Prebiotic 10%               | Synbiotic 1,2%             | Synbiotic 5%               | Synbiotic 10%              |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Hemoglobin (g/dL)</b>                     | 13,95±1,24 <sup>a</sup> | 14,82±1,31 <sup>a</sup> | 14,64±0,66 <sup>a</sup>   | 13,45±0,76 <sup>a</sup>    | 13,98±0,61 <sup>a</sup>    | 14,12±1,25 <sup>a</sup>     | 14,63±0,81 <sup>a</sup>    | 14,63±0,54 <sup>a</sup>    | 14,12±0,96 <sup>a</sup>    |
| <b>TRC (x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b> | 6,86±0,79 <sup>a</sup>  | 6,64±2,11 <sup>a</sup>  | 6,44±0,13 <sup>a</sup>    | 7,19±1,13 <sup>a</sup>     | 7,85±2,64 <sup>a</sup>     | 6,51±0,54 <sup>a</sup>      | 6,50±0,35 <sup>a</sup>     | 6,44±0,31 <sup>a</sup>     | 6,74±0,41 <sup>a</sup>     |
| <b>Hematocrit (%)</b>                        | 44,40±4,27 <sup>a</sup> | 43,00±3,52 <sup>a</sup> | 44,00±1,86 <sup>a</sup>   | 48,53±4,18 <sup>a</sup>    | 47,80±2,21 <sup>a</sup>    | 43,03±3,66 <sup>a</sup>     | 44,25±2,76 <sup>a</sup>    | 44,92±2,94 <sup>a</sup>    | 45,70±1,52 <sup>a</sup>    |
| <b>Serum iron (mg/dL)</b>                    | 238,50±52,92            | 240,50±18,17            | 277,25±24,96 <sup>b</sup> | 270,56±19,84 <sup>b</sup>  | 257,75±12,99 <sup>b</sup>  | 438,75±23,47 <sup>*/a</sup> | 332,50±39,00 <sup>ab</sup> | 353,75±25,46 <sup>ab</sup> | 265,25±46,05 <sup>b</sup>  |
| <b>TIBC (mg/dL)</b>                          | 345,25±32,32            | 324,50±14,79            | 272,00±7,53 <sup>b</sup>  | 351,33±23,48 <sup>ab</sup> | 407,75±29,47 <sup>a</sup>  | 360,50±28,72 <sup>ab</sup>  | 368,75±17,11 <sup>ab</sup> | 421,75±21,45 <sup>a</sup>  | 340,00±52,44 <sup>ab</sup> |
| <b>Albumin (mg/dL)</b>                       | 3,27±0,13               | 3,00±0,00               | 3,02±0,11 <sup>a</sup>    | 2,95±0,11 <sup>ab</sup>    | 3,12±0,10 <sup>a</sup>     | 2,87±0,03 <sup>ab</sup>     | 2,37±0,16 <sup>*/b</sup>   | 2,92±0,10 <sup>ab</sup>    | 2,70±0,17 <sup>ab</sup>    |
| <b>Urea (mg/dL)</b>                          | 24,30±0,61              | 21,76±2,02              | 19,35±1,05 <sup>a</sup>   | 21,64±1,89 <sup>a</sup>    | 16,55±0,42 <sup>a</sup>    | 22,85±1,15 <sup>a</sup>     | 24,47±3,16 <sup>a</sup>    | 23,12±1,77 <sup>a</sup>    | 17,97±2,74 <sup>a</sup>    |
| <b>Total COL (mg/dL)</b>                     | 69,42±3,59              | 78,70±4,20              | 82,10±1,88 <sup>a</sup>   | 65,23±1,12 <sup>*/b</sup>  | 75,46±1,36 <sup>ab</sup>   | 72,83±1,63 <sup>ab</sup>    | 75,33±5,22 <sup>ab</sup>   | 74,48±0,99 <sup>ab</sup>   | 74,86±1,85 <sup>ab</sup>   |
| <b>VLDL (mg/dL)</b>                          | 29,21±2,28              | 29,88±4,51              | 27,57±1,73 <sup>a</sup>   | 22,05±2,08 <sup>a</sup>    | 24,62±2,48 <sup>a</sup>    | 21,90±1,38 <sup>a</sup>     | 29,56±2,26 <sup>a</sup>    | 24,81±2,20 <sup>a</sup>    | 22,02±1,05 <sup>a</sup>    |
| <b>HDL (mg/dL)</b>                           | 40,21±2,20              | 48,84±0,62              | 54,52±1,88 <sup>a</sup>   | 43,15±1,66 <sup>a</sup>    | 50,78±3,08 <sup>a</sup>    | 50,93±2,28 <sup>a</sup>     | 45,77±3,87 <sup>a</sup>    | 49,67±1,63 <sup>a</sup>    | 52,85±1,61 <sup>a</sup>    |
| <b>TG (mg/dL)</b>                            | 68,80±5,34              | 97,25±7,40              | 75,63±2,94 <sup>*/a</sup> | 55,33±3,32 <sup>*/b</sup>  | 60,46±3,74 <sup>*/ab</sup> | 53,73±2,10 <sup>*/a</sup>   | 53,75±4,81 <sup>*/a</sup>  | 53,00±2,68 <sup>*/a</sup>  | 49,83±4,00 <sup>*/a</sup>  |

Values are mean±SE, n=6

\* Asterisks within the same row shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-b</sup> Means with unlike superscript letter in the same row are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

<sup>o</sup> TRC: total red cells, TIBC: total iron binding capacity, Total COL: total cholesterol, VLDL-C: very low density lipoproteins, HDL: high density lipoproteins, TG: triacylglycerols

Recently, Bielecka *et al.* (2002) reported that oligofructose 5% administration for fourteen days increased significantly ( $p < 0,001$ ) faecal bifidobacteria numbers in 1,6 log ufc/g respect to control group. If it was administered together with *B. longum*, this increase was in 1,4 log ufc/g. However, aerobic mesophilic count (from 7,79 to 8,81 log ufc/g) and facultatively anaerobic count did not deferred between problem and control groups. Our results do not show any effect in the first period, probably due to the fact that rats were fed with experimental diets for three days. In the second period, groups fed synbiotic diets showed an increase from 0,64 log ufc/g at 1,2% to 1,46 log ufc/g at 5% respect to control group (5,28 log ufc/g). In the last period, only the group fed prebiotic 1,2% diet showed significant ( $p < 0,05$ ) higher counts (7,07 log ufc/g) than control group (6,35 log ufc/g). Therefore, it was necessary to add 4'-GOS to probiotic infant formula to observe significant higher bifidobacteria numbers than that of control group in the second period. On the opposite, no effect was observed in the third period maybe because bifidobacteria decrease with age (Drasar and Hill, 1974; Mitsuoka, 1984).

**Table 22.** Number of total aerobes and anaerobes and bifidobacteria in faeces of rats

| Period         | Diets          | Bacteria                  |                           |                           |
|----------------|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                |                | Total aerobes             | Total anaerobes           | Bifidobacteria            |
| 8-10 days      | AO4            | 6,72±0,50                 | 8,14±0,16                 | 6,58±0,05                 |
|                | Control        | 6,86±0,24                 | 7,68±0,11                 | 6,84±0,21                 |
|                | Probiotic      | 7,97±0,07 <sup>*/a</sup>  | 7,86±0,11 <sup>a</sup>    | 7,06±0,00 <sup>b</sup>    |
|                | Prebiotic 1,2% | 6,26±0,12 <sup>*/d</sup>  | 6,40±0,11 <sup>*/c</sup>  | 6,41±0,06 <sup>c</sup>    |
|                | Prebiotic 5%   | 7,28±0,16 <sup>abc</sup>  | 7,47±0,08 <sup>ab</sup>   | 6,54±0,19 <sup>abc</sup>  |
|                | Prebiotic 10%  | 6,83±0,08 <sup>bd</sup>   | 7,23±0,07 <sup>b</sup>    | 6,83±0,06 <sup>b</sup>    |
|                | Synbiotic 1,2% | 7,01±0,03 <sup>b</sup>    | 7,74±0,24 <sup>ab</sup>   | 7,03±0,13 <sup>ab</sup>   |
|                | Synbiotic 5%   | 6,99±0,16 <sup>bcd</sup>  | 7,78±0,19 <sup>ab</sup>   | 7,25±0,03 <sup>a</sup>    |
|                | Synbiotic 10%  | 6,66±0,04 <sup>cd</sup>   | 7,37±0,07 <sup>ab</sup>   | 7,37±0,00 <sup>*/a</sup>  |
|                | 18-20 days     | AO4                       | 7,28±0,16                 | 7,75±0,11                 |
| Control        |                | 6,77±0,31                 | 7,51±0,21                 | 5,62±0,19                 |
| Probiotic      |                | 7,21±0,29 <sup>a</sup>    | 7,17±0,07 <sup>ab</sup>   | 5,13±0,07 <sup>c</sup>    |
| Prebiotic 1,2% |                | 6,70±0,13 <sup>a</sup>    | 7,14±0,07 <sup>ab</sup>   | 5,52±0,15 <sup>bc</sup>   |
| Prebiotic 5%   |                | 6,80±0,15 <sup>a</sup>    | 7,11±0,09 <sup>ab</sup>   | 5,96±0,06 <sup>b</sup>    |
| Prebiotic 10%  |                | 6,69±0,18 <sup>a</sup>    | 6,82±0,07 <sup>*/b</sup>  | 5,73±0,08 <sup>b</sup>    |
| Synbiotic 1,2% |                | 6,76±0,12 <sup>a</sup>    | 7,46±0,07 <sup>a</sup>    | 6,26±0,11 <sup>*/ab</sup> |
| Synbiotic 5%   |                | 7,58±0,24 <sup>*/a</sup>  | 7,76±0,16 <sup>a</sup>    | 7,08±0,20 <sup>*/a</sup>  |
| Synbiotic 10%  |                | 6,59±0,13 <sup>a</sup>    | 6,97±0,18 <sup>*/ab</sup> | 6,61±0,26 <sup>*/ab</sup> |
| 28-30 days     |                | AO4                       | 6,76±0,03                 | 8,03±0,17                 |
|                | Control        | 7,51±0,16                 | 8,28±0,05                 | 6,35±0,02                 |
|                | Probiotic      | 7,57±0,12 <sup>ab</sup>   | 8,05±0,06 <sup>a</sup>    | 6,89±0,08 <sup>a</sup>    |
|                | Prebiotic 1,2% | 7,01±0,08 <sup>c</sup>    | 8,12±0,04 <sup>a</sup>    | 7,07±0,03 <sup>*/a</sup>  |
|                | Prebiotic 5%   | 7,81±0,04 <sup>a</sup>    | 8,16±0,02 <sup>a</sup>    | 6,76±0,09 <sup>a</sup>    |
|                | Prebiotic 10%  | 7,08±0,18 <sup>ac</sup>   | 7,85±0,14 <sup>*/ab</sup> | 6,83±0,24 <sup>a</sup>    |
|                | Synbiotic 1,2% | 7,16±0,25 <sup>ac</sup>   | 7,73±0,19 <sup>*/ab</sup> | 6,54±0,19 <sup>a</sup>    |
|                | Synbiotic 5%   | 6,69±0,20 <sup>*/bc</sup> | 7,17±0,14 <sup>*/b</sup>  | 6,80±0,19 <sup>a</sup>    |
|                | Synbiotic 10%  | 6,35±0,28 <sup>*/bc</sup> | 7,53±0,11 <sup>*/b</sup>  | 6,72±0,21 <sup>a</sup>    |

Values are mean log cfu/g of wet feces±SE, n=6

\* within the same column in each period shows significant differences ( $p < 0,05$ ) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-d</sup> Means with unlike superscript letter in the same column in each period are significantly different by Tukey's test ( $p < 0,05$ ) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

## 4. Mineral balances

### 4.1. Balance of calcium

**Table 23** shows the mineral balance of Ca in the three periods (of three days each) of study. In the first period (8-10 days), AA of Ca in all problem groups was significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group (91,70%), except group fed prebiotic 1,2% diet (92,77%) with high standard error. In the second period (18-20 days), all groups showed a significantly ( $p < 0,05$ ) higher AA of Ca than control group (73,66%), with the exception of groups fed probiotic and synbiotic 1,2% diets (79,99 and 76,06%, respectively). Groups fed prebiotic 1,2% and 10%, and synbiotic 10% diets displayed a higher AA of Ca (93,76, 95,80 and 94,55%, respectively) than the rest of problem groups. Again, in the third period (28-30 days), all groups fed problem diets showed a higher AA of Ca than control group (58,77%), however, in group fed synbiotic 1,2% diet (64,80%) this difference was not statistically different ( $p < 0,05$ ).

Regarding to retention of Ca, in the first period the higher urinary Ca excretion in groups fed prebiotic 5 and 10% diets decreased in 8,5 and 8,7% the values of AA of Ca respectively, respect to group fed control diet. For this reason the group fed prebiotic 5% diet showed a lower retention of Ca (86,92%) than control group (91,68%), while groups fed probiotic and synbiotic 1,2 and 10% diets displayed the higher values (from 96,28 to 97,01% in synbiotic 10% and 1,2% diets, respectively). However, in the second period all groups showed a lower urinary Ca excretion and therefore the retention of Ca was higher than in control group (73,02%). Among problem groups, those fed prebiotic and synbiotic 5 and 10% diets exhibited significantly ( $p < 0,05$ ) higher values (from 82,64 to 93,53% in prebiotic 5% and synbiotic 10% diets, respectively). In the third period, retention of Ca in all groups was slightly lower than in the previous period. Again, retention of Ca in groups fed prebiotic and synbiotic 5 and 10% diets (from 76,56% in prebiotic 5% diet to 85,14% in prebiotic 10% diet) was significantly ( $p < 0,05$ ) higher than in group fed control diet (58,19%).

It is interesting to point out the high AA and retention of Ca found in all groups fed infant formula respect to that fed AO4 diet. In all groups the values decreased with time, probably due to the decrease in nutritional requirements. Urinary Ca excretion was lack in the global balance, only noticeable in groups fed prebiotic 5 and 10% diets in the first period. Groups fed synbiotic 5 and 10% diets showed a AA and retention of Ca significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group in the three periods of study, and groups fed prebiotic diets in the two last periods. In groups fed synbiotic diets at 5 and 10% respect to 1,2% concentration showed a dose-effect relationship in AA and retention of Ca in the second and third periods. However, this effect did not display significant differences ( $p < 0,05$ ) with absorption of Ca observed in the other problem groups. Groups fed synbiotic diets showed a significant ( $p < 0,05$ ) higher retention of Ca respect to those fed probiotic and prebiotic diets only in some cases.

Thus, in the first and second periods group fed synbiotic 5% diet respect to those fed prebiotic 5% diet, and in the third period the group fed synbiotic 10% respect to that fed probiotic diet.

**Table 23.** Calcium balance

| Period     | Diets          | Apparent absorption (%)    | Retention (%)              | Fecal excretion (mg/g)     | Fecal excretion (mg/d)      | Urinary excretion (mg/mL)  | Urinary excretion (mg/d)  |
|------------|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 8-10 days  | AO4            | 43,77±0,88                 | 45,34±1,94                 | 10,95±0,49                 | 86,78±1,83                  | 0,035±0,001                | 0,17±0,083                |
|            | Control        | 91,70±0,97                 | 91,68±0,97                 | 5,72±0,50                  | 4,25±0,49                   | 0,003±0,000                | 0,008±0,002               |
|            | Probiotic      | 96,97±0,33 <sup>*a</sup>   | 96,69±0,24 <sup>*/a</sup>  | 2,33±0,22 <sup>*/bd</sup>  | 0,92±0,05 <sup>*/a</sup>    | 0,043±0,014 <sup>c</sup>   | 0,091±0,034 <sup>c</sup>  |
|            | Prebiotic 1,2% | 92,77±1,89 <sup>a</sup>    | 92,41±1,86 <sup>abc</sup>  | 5,06±0,18 <sup>a</sup>     | 2,40±0,66 <sup>*/a</sup>    | 0,032±0,001 <sup>c</sup>   | 0,12±0,021 <sup>c</sup>   |
|            | Prebiotic 5%   | 95,47±0,39 <sup>*/a</sup>  | 86,92±0,54 <sup>*/c</sup>  | 3,35±0,28 <sup>*/c</sup>   | 1,64±0,12 <sup>*/a</sup>    | 0,97±0,079 <sup>*/a</sup>  | 3,09±0,17 <sup>*/a</sup>  |
|            | Prebiotic 10%  | 98,04±0,47 <sup>*/a</sup>  | 89,32±0,56 <sup>bc</sup>   | 1,52±0,13 <sup>*/b</sup>   | 0,72±0,18 <sup>*/a</sup>    | 0,79±0,029 <sup>*/a</sup>  | 3,19±0,32 <sup>*/a</sup>  |
|            | Synbiotic 1,2% | 97,04±0,79 <sup>*/a</sup>  | 97,01±0,78 <sup>*/a</sup>  | 4,37±0,10 <sup>*/a</sup>   | 0,89±0,27 <sup>*/a</sup>    | 0,006±0,001 <sup>c</sup>   | 0,008±0,002 <sup>c</sup>  |
|            | Synbiotic 5%   | 96,40±0,69 <sup>*/a</sup>  | 96,28±0,76 <sup>*/a</sup>  | 2,70±0,10 <sup>*/cd</sup>  | 1,04±0,13 <sup>*/a</sup>    | 0,026±0,012 <sup>c</sup>   | 0,032±0,019 <sup>c</sup>  |
|            | Synbiotic 10%  | 97,95±0,69 <sup>*/a</sup>  | 93,02±2,01 <sup>ab</sup>   | 2,05±0,08 <sup>*/bd</sup>  | 0,63±0,21 <sup>*/a</sup>    | 0,48±0,052 <sup>*/b</sup>  | 1,51±0,39 <sup>*/b</sup>  |
| 18-20 days | AO4            | 39,57±2,27                 | 38,32±2,45                 | 10,50±0,27                 | 120,33±8,36                 | 0,34±0,066                 | 2,51±0,53                 |
|            | Control        | 73,66±1,57                 | 73,02±1,39                 | 11,65±0,71                 | 15,44±0,29                  | 0,15±0,084                 | 0,48±0,29                 |
|            | Probiotic      | 79,99±1,07 <sup>cd</sup>   | 79,38±1,15 <sup>c</sup>    | 8,36±0,48 <sup>bcd</sup>   | 7,95±0,60 <sup>*/a</sup>    | 0,10±0,017 <sup>bc</sup>   | 0,24±0,046 <sup>bc</sup>  |
|            | Prebiotic 1,2% | 93,76±1,04 <sup>*/a</sup>  | 92,09±1,07 <sup>*/ab</sup> | 5,85±0,51 <sup>*/bce</sup> | 2,98±0,46 <sup>*/b</sup>    | 0,40±0,045 <sup>a</sup>    | 0,79±0,096 <sup>abc</sup> |
|            | Prebiotic 5%   | 84,03±1,97 <sup>*/bc</sup> | 82,64±1,81 <sup>*/c</sup>  | 9,64±1,20 <sup>bc</sup>    | 7,32±0,69 <sup>*/a</sup>    | 0,28±0,046 <sup>abc</sup>  | 0,65±0,11 <sup>abc</sup>  |
|            | Prebiotic 10%  | 95,80±1,29 <sup>*/a</sup>  | 92,85±1,49 <sup>*/ab</sup> | 3,74±0,75 <sup>*/e</sup>   | 2,05±0,75 <sup>*/b</sup>    | 0,38±0,097 <sup>ab</sup>   | 1,42±0,38 <sup>*/a</sup>  |
|            | Synbiotic 1,2% | 76,06±1,13 <sup>d</sup>    | 76,02±1,14 <sup>c</sup>    | 14,58±1,60 <sup>a</sup>    | 8,42±0,22 <sup>*/a</sup>    | 0,013±0,001 <sup>c</sup>   | 0,017±0,005 <sup>c</sup>  |
|            | Synbiotic 5%   | 91,24±0,73 <sup>*/ab</sup> | 91,22±0,73 <sup>*/ab</sup> | 5,32±0,50 <sup>*/bce</sup> | 3,46±0,30 <sup>*/b</sup>    | 0,010±0,003 <sup>c</sup>   | 0,012±0,004 <sup>c</sup>  |
|            | Synbiotic 10%  | 94,55±3,14 <sup>*/a</sup>  | 93,53±3,36 <sup>*/a</sup>  | 3,41±1,06 <sup>*/de</sup>  | 2,22±1,17 <sup>*/b</sup>    | 0,012±0,005 <sup>abc</sup> | 0,43±0,092 <sup>abc</sup> |
| 28-30 days | AO4            | 29,48±4,74                 | 29,06±4,75                 | 12,90±0,78                 | 149,00±7,70                 | 0,12±0,007                 | 0,89±0,029                |
|            | Control        | 58,77±2,94                 | 58,19±2,94                 | 12,53±1,22                 | 26,74±2,82                  | 0,065±0,016                | 0,37±0,025                |
|            | Probiotic      | 69,79±4,03 <sup>*/bc</sup> | 68,94±4,00 <sup>bc</sup>   | 10,76±0,77 <sup>a</sup>    | 18,10±1,91 <sup>*/a</sup>   | 0,21±0,014 <sup>a</sup>    | 0,59±0,076 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 1,2% | 82,69±0,95 <sup>*/a</sup>  | 81,70±1,16 <sup>*/a</sup>  | 8,46±0,61 <sup>a</sup>     | 10,77±0,83 <sup>*/bcd</sup> | 0,17±0,034 <sup>a</sup>    | 0,63±0,14 <sup>a</sup>    |
|            | Prebiotic 5%   | 77,25±3,93 <sup>*/a</sup>  | 76,56±3,91 <sup>*/ab</sup> | 10,86±1,69 <sup>ab</sup>   | 15,37±2,52 <sup>*/ac</sup>  | 0,14±0,028 <sup>a</sup>    | 0,47±0,091 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 10%  | 85,75±0,84 <sup>*/a</sup>  | 85,14±0,86 <sup>*/a</sup>  | 8,93±0,82 <sup>ab</sup>    | 10,32±0,79 <sup>*/ad</sup>  | 0,22±0,075 <sup>a</sup>    | 0,44±0,043 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 1,2% | 64,80±3,01 <sup>c</sup>    | 62,34±3,53 <sup>c</sup>    | 15,71±2,53 <sup>ab</sup>   | 17,58±1,91 <sup>*/ab</sup>  | 0,15±0,041 <sup>a</sup>    | 0,35±0,068 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 5%   | 80,69±0,82 <sup>*/ab</sup> | 79,65±0,84 <sup>*/ab</sup> | 7,18±0,88 <sup>ab</sup>    | 10,11±0,88 <sup>*/bcd</sup> | 0,22±0,056 <sup>a</sup>    | 0,54±0,036 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 10%  | 86,26±2,06 <sup>*/a</sup>  | 85,13±2,09 <sup>*/a</sup>  | 4,09±0,46 <sup>*/b</sup>   | 7,08±0,79 <sup>*/d</sup>    | 0,17±0,063 <sup>a</sup>    | 0,59±0,17 <sup>a</sup>    |

Values are mean±SE, n=6

\* Asterisks within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group for each period

<sup>a-e</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets for each period

The high percentages of Ca absorption obtained with the problem groups in our study (more than 65%), have been also reported by other authors using various NDO such as SCFOS, TGOS and 4'-GOS at 5 and 10% (Chonan and Watanuki, 1995; Chonan and Takahashi, 1999; Ohta *et al.*, 1998d; Chonan *et al.*, 2001). Moreover, Chonan and Watanuki (1996) described that in low Ca containing diets (215 mg Ca/100 g), which was closer to that used in our work (571,72 mg Ca/100 g), the administration of 5% 6'-GOS to rats during 30 days produced an AA of Ca significantly ( $p < 0,05$ ) higher (>95%) than when normal Ca containing diet (2.150 mg Ca/100 g) was used in the three periods of mineral balance.

Other authors (Sarriá *et al.*, 2001) also found high percentages of Ca absorption, around 97% in fed infant formula suckling rats during seven days. The authors associated these values to the high lactulose content in infant formulas, and the development in weaning rats that apart of the passive diffusion, main mechanism of Ca absorption during the first two weeks of a rat's life, it is also increased the saturable carrier-mediated Ca transport (Bronner, 1987). In our work, Ca AA percentages in group fed control infant formula in the first period was slightly lower (91,7%) to that described by Sarriá *et al.*, although AA of Ca increased significantly ( $p < 0,05$ ) when probiotics and prebiotics were added. Moreover, it is important to remember that the majority of the studies use young rats, which have increased their Ca requirements because of bone formation (NRC, 1991) during the growth period.

During infant formula industrial elaboration thermal processes such as drying and sterilization are used, that might induce lactose isomerization producing lactulose. Although the amount of lactulose produced during heating is lack due to the low water activity of the product and the relatively mild thermal conditions (Sarriá *et al.*, 2001), lactulose reaches the colon practically intact because it resists enzymatic hydrolysis in the small intestine. This isomeric of lactose enhances Ca absorption more intensively than lactose (Brommage *et al.*, 1993). The infant formula used in our study was dried and pasteurized during industrial processing, and the probable lactulose formed (90-150 mg/L in powder infant formulas (Sarriá-Ruiz, 1998) might explain the high AA of Ca observed in groups fed infant formula with respect that fed AO4 diet.

Another reason for explaining the high percentages of Ca AA obtained, may be the source of Ca (calcium chloride and citrate) used in the mineral blend added to the infant formula, since calcium citrate has the advantage of high solubility over other Ca sources commonly used in Ca supplements such as calcium carbonate (Harvey *et al.*, 1988).

In Ca absorption also influence the protein source used in the infant formula. Lönnnerdal *et al.* (1994) studied mineral bioavailability in suckling rats fed cow milk, human milk and infant formulas with different protein sources (casein, whey protein, protein hydrolysates or soy protein). The authors observed that Ca absorption from infant formulas, except that containing soy as protein source, was higher than 70%.

Although from a nutritional point of view infant formula mimics human milk composition, it is accepted that human milk is the best Ca source for infants. Some reasons explain Ca bioavailability differences between human milk and infant formulas. In human milk

Ca is mainly bound to whey proteins or as a part of low molecular weight complexes, while in cow milk it is bound to casein (Fransson and Lönnerdal, 1983). Moreover, it might influence the different distribution of Ca between casein and whey proteins, since the main casein in human milk is  $\beta$ -casein, in cow milk it is  $\alpha$ -casein (Kunz and Lönnerdal, 1992). While among whey proteins lactoferrin is the major protein in human milk,  $\beta$ -lactoglobuline is in cow milk (Lönnerdal, 1997). It should be also mentioned that phosphopeptides formed during enzymatic digestion of casein, more probably in human milk than in cow milk, has a positive effect on Ca absorption (Mellander, 1950) because of its ability to bind Ca and inhibit its precipitation and thus maintain it soluble in intestinal lumen.

As conclusion of Ca balance, all groups showed in any of the periods all problem groups an AA and retention significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group. Prebiotics addition was more efficient than probiotics addition since while group fed probiotic diet was clearly higher than control group in the first period, groups fed prebiotic diets were during the two last periods. The increase in 4'-GOS concentration added to diets did not show a clear dose-effect relationship on Ca absorption. The conjunct addition of both in synbiotic diets neither displayed a clear enhancement on Ca absorption. However, groups fed synbiotic 5 and 10% diets were the more efficient because showed a AA and retention of Ca significantly ( $p < 0,05$ ) higher than group fed control diet during the three periods.

#### 4.2. Balance of magnesium

**Table 24** shows the mineral balance of Mg in the three periods (of three days each) of study. In the first period, the only group with an AA of Mg significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group (82,85%) was that fed synbiotic 10% diet (94,74%). Among problem groups, those fed prebiotic 5 and 10% and synbiotics diets showed the higher percentages (from 86,68% in prebiotic 5% diet to 94,74% in synbiotic 10% diet) because excreted a daily Mg amount in faeces significantly ( $p < 0,05$ ) lower than control group (0,73 mg/day). In the second period, groups fed prebiotic 1,2 and 10% diets and synbiotic 5 and 10% diets showed values significantly ( $p < 0,05$ ) higher (from 90,35% in prebiotic 1,2% diet to 95,06% in synbiotic 10% diet) than groups fed control (81,92%) and probiotic diets. In the third period, except groups fed probiotic and prebiotic 5% diets (76,95 and 81,18%, respectively), the remaining groups displayed an AA of Mg significantly ( $p < 0,05$ ) higher (from 85,59% in prebiotic 1,2% diet to 90,90% in synbiotic 10% diet) than control group (76,63%).

Urinary Mg excretion was more intensive than in Ca balance, reducing significantly the Mg retention. Thus, group fed synbiotic 10% diet decreased a 3,3 and 3,7% respect to AA of Mg percentages in the two first periods, while in the third period groups fed synbiotic 1,2 and 5% diets excreted more Mg in urine since the percentages decreased 16,8 and 23,15%, respectively. In the first period, only group fed prebiotic 1,2% diet showed a percentage

(66,97%) significantly ( $p < 0,05$ ) lower than control group (81,78%) because it excreted a daily Mg amount in urine significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group (0,046 mg/day). Among problem groups, those fed prebiotic 5 and 10% and synbiotic diets showed the higher values (from 86,49% in prebiotic 5% diet to 91,45% in synbiotic 10% diet). In the second period, groups fed prebiotic 10% and synbiotic 5 and 10% diets displayed percentages significantly ( $p < 0,05$ ) higher (90,48, 92,61 and 89,67%, respectively) than control group (78,41%), but not with the remaining prebiotic and synbiotic diets. In the third period, groups fed prebiotic diets and synbiotic 10% diet showed the significantly ( $p < 0,05$ ) higher values than control group (from 80,99% in prebiotic 5% diet to 90,69% in synbiotic 10% diet). However, groups fed synbiotic 1,2 and 5% diets displayed the lowest values due to the higher Mg excretion in urine.

AA and retention of Mg were again higher in groups fed infant formula than in group fed AO4 diet. In all groups the percentages were decreasing with the age of the rats, although on the contrary to Ca, the number of groups with an AA and retention of Mg significantly ( $p < 0,05$ ) higher to control group was increasing in the time. Groups fed prebiotic 10% and synbiotic 5 and 10% diets showed an AA and retention of Mg significantly ( $p < 0,05$ ) higher than group fed control diet in the two last periods, and group fed synbiotic 10% diet in all periods. The dose-effect relationship in 4'-GOS concentration was only observed in prebiotic diets in the first period and synbiotic diets in the third period.

Various studies in rats exhibit that the addition of NDO increases significantly Mg absorption. For example, the administration of 4'-GOS 5% diets to rats resulted in 87,4% of Mg AA while 56,9% in control group (Chonan *et al.*, 2001). Using laparotomized rats, the addition of 5% GOS to diet showed a 90,6% in AA of Mg opposite to 60,2% in control group (Chonan and Takahashi, 1999). In other study, the administration of a diet supplemented with 5% SCFOS during three periods of mineral balance (3-7 days, 14-18 days and 27-31 days) produced a AA of Mg significantly ( $p < 0,01$ ) higher (83,1, 78,3 and 73,3%, respectively) than control group (61, 55,3 and 49,8%, respectively) (Ohta *et al.*, 1993). Delzenne *et al.* (1995) found in rats fed diet (0,1 g/100 g Mg) containing 10% inulin or oligofructose, a 75% of Mg retention. Five weeks old rats fed 10% SCFOS diet showed a 90,7% of Mg retention in the first period (10-14 days) and 85,9% in the second period (24-28 days) (Ohta *et al.*, 1998d). According to these references we might affirm that AA and retention of Mg increase in the present study due to 4'-GOS containing diet agrees with data found in the bibliography.

Nevertheless, in Mg absorption influence other factors such as the concentration of other minerals present in the diet (Ohta *et al.*, 1994a). These authors observed that with the use of normal Ca (520 mg/ 100 g) and normal P contents diet (800 mg/100 g), the AA of Mg was higher (83,6%) than in normal Ca and high P contents diet (1.200 mg/ 100 g) (59,3%). In our study, Ca and P contents were considered as normal (572 and 344 mg/100 g respectively).

Balance studies in healthy term infants (Skyberg *et al.*, 1968) showed a 55-75% of Mg absorption, similar to those in our study. It is known that Mg absorption in young rats, as in man (Shils, 1988), it is not produced by active transport, thus passive diffusion via pericellular

pathway appears to be the only absorptive mechanism during the first weeks (Meneely *et al.*, 1982). One explanation for this similarity, might be that the major Mg found in human milk and infant formula, which is located in the soluble fraction (92% in the whey fraction of human milk and 83% in the whey based formula) (Lönnerdal *et al.*, 1993). Furthermore, these authors in suckling rats reported that neither Mg nor Ca amount in the diet, or different Mg sources used in infant formulas (MgHPO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgO) affected Mg absorption. They also pointed that probably the high content of ligands in infant formula could help to make soluble Mg as it was demonstrated in an *in vitro* study mimicking the conditions of the gastrointestinal tract, where citrate showed the highest capacity to form absorbable complexes with Mg (Blaquiere and Berthon, 1987).

For Mg balance it can be concluded that the percentages of AA and retention of Mg in problem groups were significantly higher than in control group in the second and third periods. Group fed probiotic formula showed the lowest values and it never was significantly higher than control group. A clear dose-effect relationship was observed in groups fed prebiotic diet in the first period and in fed synbiotic diet in the third period. The larger effect of synbiotic diets with respect to prebiotic diets was only observed in AA and retention of Mg of the group fed synbiotic 1,2% diet and in AA of Mg of the group fed synbiotic 5% diet. However, prebiotic 10% and synbiotic 5 and 10% diets were the most efficient for showing a higher AA and retention of Mg in the two last periods.

#### **4.3. Balance of phosphorous**

**Table 25** shows the mineral balance of P in the three periods (of three days each) of study. In the first period, no problem group showed significant differences ( $p < 0,05$ ) neither respect to control group (93,13%) nor among problem groups with values ranging from 90,68 to 96,23%. In the second period, only group fed prebiotic 10% diet displayed an AA significantly ( $p < 0,05$ ) higher (94,24%) than control group (82,38%), because excreted daily less P in faeces than control group (5,86 mg/day). In the third period, groups fed probiotic and prebiotic 1,2 and 10% diets (85,82, 87,73 and 91,63%, respectively) showed a AA significantly ( $p < 0,05$ ) larger than control group (79,04%), excreting in faeces the two last groups lower amount of P than group fed control diet (8,45 mg/day).

Due that P excretion in urine was more important than the previous minerals, retention percentages decreased noticeable. This reduction was more accused in groups fed synbiotic 1,2 and 5% diet in all periods. Thus, in the first period this reduction was of 19,2 and 9,5%, respectively, in the second period of 8 and 12,2%, respectively, and in the third period of 16 and 17%, respectively. Regarding retention percentages in the first period, only groups fed synbiotic 1,2 and 5% diets (77,07 and 81,17%, respectively) showed significant differences due to the significant ( $p < 0,05$ ) P urine losses.

**Table 24.** Magnesium balance

| Period     | Diets                 | Apparent absorption (%)   | Retention (%)            | Fecal excretion (mg/g)   | Fecal excretion (mg/d)   | Urinary excretion (mg/mL) | Urinary excretion (mg/d)   |
|------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 8-10 days  | <b>AO4</b>            | 52,06±2,53                | 50,30±2,83               | 1,70±0,10                | 14,99±1,19               | 0,13±0,035                | 0,55±0,10                  |
|            | <b>Control</b>        | 82,85±3,94                | 81,78±3,89               | 0,96±0,16                | 0,73±0,16                | 0,014±0,007               | 0,046±0,022                |
|            | <b>Probiotic</b>      | 80,86±3,42 <sup>b</sup>   | 77,50±3,45 <sup>bc</sup> | 1,30±0,10 <sup>ab</sup>  | 0,52±0,07 <sup>b</sup>   | 0,046±0,006 <sup>a</sup>  | 0,092±0,014 <sup>abc</sup> |
|            | <b>Prebiotic 1,2%</b> | 71,47±1,44 <sup>c</sup>   | 66,97±2,67 <sup>*c</sup> | 1,41±0,04 <sup>a</sup>   | 0,78±0,10 <sup>a</sup>   | 0,047±0,007 <sup>a</sup>  | 0,18±0,015 <sup>*a</sup>   |
|            | <b>Prebiotic 5%</b>   | 86,68±0,60 <sup>ab</sup>  | 86,49±0,76 <sup>ab</sup> | 0,87±0,08 <sup>bc</sup>  | 0,42±0,02 <sup>b</sup>   | 0,002±0,000 <sup>a</sup>  | 0,006±0,005 <sup>bc</sup>  |
|            | <b>Prebiotic 10%</b>  | 90,54±1,59 <sup>a</sup>   | 90,08±1,58 <sup>a</sup>  | 0,61±0,02 <sup>c</sup>   | 0,28±0,05 <sup>*bc</sup> | 0,003±0,000 <sup>a</sup>  | 0,014±0,001 <sup>b</sup>   |
|            | <b>Synbiotic 1,2%</b> | 89,69±1,87 <sup>ab</sup>  | 87,68±1,85 <sup>ab</sup> | 1,54±0,12 <sup>*a</sup>  | 0,29±0,06 <sup>*bc</sup> | 0,037±0,005 <sup>a</sup>  | 0,051±0,002 <sup>ac</sup>  |
|            | <b>Synbiotic 5%</b>   | 87,40±1,29 <sup>ab</sup>  | 86,60±1,40 <sup>ab</sup> | 0,86±0,15 <sup>c</sup>   | 0,32±0,03 <sup>*bc</sup> | 0,015±0,007 <sup>a</sup>  | 0,022±0,011 <sup>bc</sup>  |
|            | <b>Synbiotic 10%</b>  | 94,74±1,77 <sup>*a</sup>  | 91,45±3,91 <sup>a</sup>  | 0,44±0,01 <sup>*c</sup>  | 0,14±0,04 <sup>*c</sup>  | 0,037±0,033 <sup>a</sup>  | 0,09±0,07 <sup>abc</sup>   |
| 18-20 days | <b>AO4</b>            | 57,42±0,79                | 54,63±0,99               | 1,45±0,07                | 16,56±0,54               | 0,14±0,02                 | 1,071±0,14                 |
|            | <b>Control</b>        | 81,92±1,46                | 78,41±0,57               | 0,71±0,01                | 0,85±0,14                | 0,046±0,005               | 0,16±0,036                 |
|            | <b>Probiotic</b>      | 78,33±2,54 <sup>d</sup>   | 77,16±2,56 <sup>b</sup>  | 0,96±0,15 <sup>a</sup>   | 0,78±0,10 <sup>a</sup>   | 0,018±0,008 <sup>c</sup>  | 0,044±0,02 <sup>*b</sup>   |
|            | <b>Prebiotic 1,2%</b> | 90,35±1,74 <sup>*ac</sup> | 84,29±1,94 <sup>ab</sup> | 0,78±0,05 <sup>abc</sup> | 0,40±0,07 <sup>*bc</sup> | 0,13±0,011 <sup>*a</sup>  | 0,25±0,008 <sup>*a</sup>   |
|            | <b>Prebiotic 5%</b>   | 84,93±1,53 <sup>bcd</sup> | 84,73±1,52 <sup>ab</sup> | 0,79±0,03 <sup>ab</sup>  | 0,61±0,04 <sup>ab</sup>  | 0,004±0,000 <sup>*c</sup> | 0,008±0,000 <sup>*b</sup>  |
|            | <b>Prebiotic 10%</b>  | 91,13±1,13 <sup>*ab</sup> | 90,48±1,31 <sup>*a</sup> | 0,68±0,02 <sup>abc</sup> | 0,34±0,05 <sup>*bc</sup> | 0,007±0,003 <sup>*c</sup> | 0,023±0,01 <sup>*b</sup>   |
|            | <b>Synbiotic 1,2%</b> | 87,53±0,65 <sup>ab</sup>  | 86,53±0,78 <sup>a</sup>  | 0,70±0,06 <sup>abc</sup> | 0,41±0,02 <sup>*bc</sup> | 0,021±0,008 <sup>bc</sup> | 0,032±0,017 <sup>*b</sup>  |
|            | <b>Synbiotic 5%</b>   | 93,49±0,44 <sup>*ab</sup> | 92,61±0,27 <sup>*a</sup> | 0,34±0,04 <sup>bc</sup>  | 0,22±0,01 <sup>*c</sup>  | 0,024±0,008 <sup>bc</sup> | 0,03±0,013 <sup>*b</sup>   |
|            | <b>Synbiotic 10%</b>  | 95,06±0,98 <sup>*a</sup>  | 89,67±2,45 <sup>*a</sup> | 0,32±0,03 <sup>c</sup>   | 0,18±0,03 <sup>*c</sup>  | 0,053±0,008 <sup>b</sup>  | 0,19±0,045 <sup>ab</sup>   |
| 28-30 days | <b>AO4</b>            | 52,64±3,33                | 50,08±3,00               | 1,69±0,12                | 19,58±0,99               | 0,136±0,021               | 1,07±0,19                  |
|            | <b>Control</b>        | 76,63±1,78                | 72,00±1,53               | 0,66±0,09                | 1,32±0,14                | 0,046±0,012               | 0,26±0,008                 |
|            | <b>Probiotic</b>      | 76,95±2,03 <sup>d</sup>   | 71,80±3,17 <sup>b</sup>  | 0,76±0,07 <sup>ab</sup>  | 1,18±0,10 <sup>a</sup>   | 0,10±0,04 <sup>b</sup>    | 0,25±0,10 <sup>b</sup>     |
|            | <b>Prebiotic 1,2%</b> | 85,59±1,49 <sup>*ac</sup> | 81,33±1,25 <sup>*a</sup> | 0,60±0,03 <sup>ab</sup>  | 0,77±0,10 <sup>*bc</sup> | 0,075±0,044 <sup>b</sup>  | 0,21±0,12 <sup>b</sup>     |
|            | <b>Prebiotic 5%</b>   | 81,18±1,15 <sup>bcd</sup> | 80,99±1,15 <sup>*a</sup> | 0,79±0,05 <sup>a</sup>   | 1,08±0,05 <sup>ab</sup>  | 0,003±0,000 <sup>b</sup>  | 0,011±0,000 <sup>b</sup>   |
|            | <b>Prebiotic 10%</b>  | 89,85±0,89 <sup>*a</sup>  | 89,68±0,92 <sup>*a</sup> | 0,57±0,09 <sup>ac</sup>  | 0,60±0,06 <sup>*c</sup>  | 0,002±0,000 <sup>b</sup>  | 0,009±0,001 <sup>b</sup>   |
|            | <b>Synbiotic 1,2%</b> | 85,65±1,48 <sup>*ab</sup> | 63,54±0,57 <sup>bc</sup> | 0,54±0,02 <sup>bc</sup>  | 0,64±0,09 <sup>*c</sup>  | 0,42±0,034 <sup>*a</sup>  | 0,97±0,06 <sup>*a</sup>    |
|            | <b>Synbiotic 5%</b>   | 89,90±1,67 <sup>*a</sup>  | 60,03±3,66 <sup>*c</sup> | 0,31±0,04 <sup>*c</sup>  | 0,45±0,08 <sup>*c</sup>  | 0,50±0,11 <sup>*a</sup>   | 1,34±0,24 <sup>*ab</sup>   |
|            | <b>Synbiotic 10%</b>  | 90,90±2,03 <sup>*a</sup>  | 90,69±2,05 <sup>*a</sup> | 0,23±0,04 <sup>*c</sup>  | 0,40±0,07 <sup>*c</sup>  | 0,002±0,000 <sup>b</sup>  | 0,009±0,001 <sup>b</sup>   |

Values are mean±SE, n=6

\* Asterisks within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group for each period

<sup>a-d</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets for each period

In the second period, as in AA the only group with a retention of P significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group (81,28%) was showed by group fed prebiotic 10% diet (92,70%), although it did not display significant differences ( $p < 0,05$ ) with groups fed prebiotic diets and synbiotic 10% diet (88,67, 85,52 and 86,66%, respectively). On the contrary, groups with the lowest percentages were those fed probiotic and synbiotic 5% diets (75,16 and 74,53%, respectively) to be the two groups with higher P excreted in urine per day. In the third period, only groups fed prebiotic 1,2 and 10% diets showed the significantly ( $p < 0,05$ ) higher values (86,23 and 90,20%, respectively) than control group (72,53%). The groups with the lowest retention percentages were those fed probiotic and synbiotics diets (from 63,91% in synbiotic 1,2% diet to 70,39% in synbiotic 10% diet) due to their higher P excretion in urine.

Concluding P balance, it can be again mentioned the high AA and retention percentages found in all groups fed infant formula respect to that fed AO4 diet. It is important also to stand out that in all groups the percentages were decreasing in time. As in Mg, the number of groups with a AA and retention of P significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group was increasing along the study. It was also observed a clear effect in urinary excretion of P in groups fed synbiotic 1,2 and 5% diets, reducing significantly ( $p < 0,05$ ) the percentages of retention in the first period and groups fed synbiotic 1,2% diet in the third period.

The studies about the effect of NDO on P absorption are quite scarce. Ohta *et al.* (1993) observed that dietary 5% SCFOS administration to rats, produced a significant ( $p < 0,05$ ) increase of P AA, while GOS and raffinose did not show differences with control group. In four weeks old rats fed a diet containing 5% of SCFOS it was obtained a AA of P of 90 and 95% when Ca and Mg were infused into the stomach and cecum, respectively (Ohta *et al.*, 1997). Ohta *et al.* (1994a) described that the administration to rats of diets with high Ca content (1.040 mg/100 g) decreased the AA of P (about 20%). In our study, the effect of dietetic Ca concentration was not determinant to modify the absorption of P, since the level of Ca in the diets used can be considered as moderate (572 mg/100 g). The values of AA of P obtained in the study (1<sup>st</sup> period) agree with those reported by Ohta *et al.* (1994a) (93%) when the Ca content of the diet was similar to that we used (520 mg/100 g).

To finish P balance, it can be concluded that only groups fed probiotic and prebiotics 1,2 and 10% diets showed a P absorption significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group in any of the three periods of mineral balance. Group fed probiotic diet did not display a higher effect respect to those fed prebiotic diets. As with the previous minerals, at any period could be established a dose-effect relationship between 4'-GOS concentration and P absorption. The only group showing a AA and retention significantly ( $p < 0,05$ ) higher than group fed control diet in the two last periods was that fed prebiotic 10% diet. Groups fed synbiotics diets did not show any enhancement in P absorption respect to those fed prebiotic diets.

**Table 25.** Phosphorus balance

| Period     | Diets          | Apparent absorption (%)    | Retention (%)              | Fecal excretion (mg/g)    | Fecal excretion (mg/d)    | Urinary excretion (mg/mL) | Urinary excretion (mg/d)   |
|------------|----------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 8-10 days  | AO4            | 33,87±3,38                 | 33,11±3,47                 | 7,86±0,45                 | 69,51±5,44                | 0,17±0,030                | 0,78±0,18                  |
|            | Control        | 93,13±0,55                 | 92,92±0,54                 | 2,97±0,07                 | 2,21±0,18                 | 0,02±0,007                | 0,065±0,01                 |
|            | Probiotic      | 95,40±0,28 <sup>a</sup>    | 88,70±0,86 <sup>ab</sup>   | 2,85±0,17 <sup>bcd</sup>  | 1,14±0,06 <sup>*/a</sup>  | 0,83±0,064 <sup>*/c</sup> | 1,65±0,19 <sup>*/bc</sup>  |
|            | Prebiotic 1,2% | 92,04±1,84 <sup>a</sup>    | 91,88±1,84 <sup>ab</sup>   | 3,11±0,09 <sup>c</sup>    | 1,44±0,35 <sup>a</sup>    | 0,071±0,003 <sup>e</sup>  | 0,028±0,01 <sup>d</sup>    |
|            | Prebiotic 5%   | 93,00±0,56 <sup>a</sup>    | 91,06±0,84 <sup>ab</sup>   | 3,01±0,16 <sup>bcd</sup>  | 1,47±0,10 <sup>a</sup>    | 0,12±0,017 <sup>de</sup>  | 0,41±0,084 <sup>bc</sup>   |
|            | Prebiotic 10%  | 95,95±0,64 <sup>a</sup>    | 94,21±0,53 <sup>a</sup>    | 1,71±0,04 <sup>*/d</sup>  | 0,79±0,14 <sup>*/a</sup>  | 0,085±0,002 <sup>de</sup> | 0,34±0,03 <sup>bc</sup>    |
|            | Synbiotic 1,2% | 96,23±0,90 <sup>a</sup>    | 77,07±2,88 <sup>*/c</sup>  | 4,03±0,03 <sup>*/ab</sup> | 0,80±0,22 <sup>*/a</sup>  | 2,76±0,108 <sup>*/a</sup> | 3,90±0,58 <sup>*/a</sup>   |
|            | Synbiotic 5%   | 90,68±1,89 <sup>a</sup>    | 81,17±4,04 <sup>*/bc</sup> | 4,91±0,18 <sup>*/a</sup>  | 1,90±0,28 <sup>a</sup>    | 1,56±0,157 <sup>*/b</sup> | 1,96±0,51 <sup>*/b</sup>   |
|            | Synbiotic 10%  | 93,23±2,34 <sup>a</sup>    | 88,87±2,98 <sup>abc</sup>  | 4,00±0,21 <sup>*/ac</sup> | 1,27±0,44 <sup>a</sup>    | 0,41±0,071 <sup>*/d</sup> | 1,19±0,11 <sup>*/bcd</sup> |
| 18-20 days | AO4            | 31,54±1,91                 | 25,01±6,00                 | 8,49±0,72                 | 97,31±10,77               | 0,15±0,001                | 1,12±0,12                  |
|            | Control        | 82,38±4,39                 | 81,28±4,37                 | 4,28±0,61                 | 5,86±1,49                 | 0,11±0,008                | 0,37±0,001                 |
|            | Probiotic      | 88,22±0,45 <sup>b</sup>    | 81,86±0,45 <sup>c</sup>    | 4,61±0,31 <sup>b</sup>    | 3,81±0,16 <sup>a</sup>    | 0,86±0,026 <sup>*/b</sup> | 2,05±0,068 <sup>*/b</sup>  |
|            | Prebiotic 1,2% | 90,85±1,78 <sup>ab</sup>   | 88,67±1,65 <sup>ab</sup>   | 4,61±0,34 <sup>b</sup>    | 2,38±0,43 <sup>*/bc</sup> | 0,30±0,054 <sup>c</sup>   | 0,58±0,089 <sup>d</sup>    |
|            | Prebiotic 5%   | 87,47±1,53 <sup>b</sup>    | 85,52±1,64 <sup>bc</sup>   | 4,36±0,34 <sup>bc</sup>   | 3,36±0,32 <sup>ab</sup>   | 0,22±0,031 <sup>c</sup>   | 0,52±0,082 <sup>d</sup>    |
|            | Prebiotic 10%  | 94,24±1,04 <sup>*/a</sup>  | 92,70±1,02 <sup>*/a</sup>  | 2,86±0,27 <sup>c</sup>    | 1,46±0,31 <sup>*/c</sup>  | 0,11±0,011 <sup>cd</sup>  | 0,38±0,031 <sup>d</sup>    |
|            | Synbiotic 1,2% | 84,97±1,30 <sup>b</sup>    | 79,86±1,50 <sup>c</sup>    | 6,92±0,75 <sup>*/a</sup>  | 3,92±0,15 <sup>ab</sup>   | 1,25±0,34 <sup>*/b</sup>  | 1,33±0,15 <sup>*/c</sup>   |
|            | Synbiotic 5%   | 86,75±0,49 <sup>b</sup>    | 71,69±1,13 <sup>d</sup>    | 5,72±0,41 <sup>ab</sup>   | 3,71±0,14 <sup>ab</sup>   | 3,18±0,13 <sup>*/a</sup>  | 4,21±0,12 <sup>*/a</sup>   |
|            | Synbiotic 10%  | 88,33±2,23 <sup>ab</sup>   | 86,66±2,42 <sup>abc</sup>  | 5,39±0,51 <sup>ab</sup>   | 3,04±0,48 <sup>ab</sup>   | 0,12±0,019 <sup>cd</sup>  | 0,43±0,04 <sup>d</sup>     |
| 28-30 days | AO4            | 40,56±1,21                 | 33,64±6,08                 | 7,87±0,69                 | 90,80±6,73                | 0,17±0,005                | 1,33±0,06                  |
|            | Control        | 79,04±1,59                 | 72,53±1,75                 | 4,25±0,37                 | 8,45±0,46                 | 0,49±0,05                 | 2,64±0,43                  |
|            | Probiotic      | 85,82±1,32 <sup>*/ab</sup> | 67,90±1,52 <sup>c</sup>    | 4,15±0,38 <sup>ab</sup>   | 6,50±0,63 <sup>a</sup>    | 2,92±0,14 <sup>*/a</sup>  | 8,27±0,54 <sup>*/a</sup>   |
|            | Prebiotic 1,2% | 87,73±1,06 <sup>*/ab</sup> | 86,23±1,12 <sup>*/a</sup>  | 3,23±0,21 <sup>b</sup>    | 4,15±0,41 <sup>*/bc</sup> | 0,15±0,018 <sup>b</sup>   | 0,51±0,06 <sup>d</sup>     |
|            | Prebiotic 5%   | 82,61±0,81 <sup>b</sup>    | 78,08±1,49 <sup>b</sup>    | 4,87±0,29 <sup>ab</sup>   | 6,70±0,26 <sup>a</sup>    | 0,53±0,13 <sup>b</sup>    | 1,76±0,42 <sup>cd</sup>    |
|            | Prebiotic 10%  | 91,63±0,86 <sup>*/a</sup>  | 90,20±1,02 <sup>*/a</sup>  | 3,09±0,51 <sup>b</sup>    | 3,24±0,34 <sup>*/c</sup>  | 0,14±0,032 <sup>b</sup>   | 0,55±0,15 <sup>d</sup>     |
|            | Synbiotic 1,2% | 79,97±3,09 <sup>ab</sup>   | 63,91±4,38 <sup>*/c</sup>  | 5,82±0,96 <sup>a</sup>    | 6,82±1,18 <sup>ab</sup>   | 2,21±0,76 <sup>*/a</sup>  | 5,29±1,86 <sup>ab</sup>    |
|            | Synbiotic 5%   | 81,15±1,40 <sup>ab</sup>   | 64,15±3,57 <sup>c</sup>    | 4,92±0,45 <sup>ab</sup>   | 7,02±0,85 <sup>a</sup>    | 2,21±0,19 <sup>*/a</sup>  | 6,19±1,31 <sup>*/a</sup>   |
|            | Synbiotic 10%  | 75,76±3,26 <sup>ab</sup>   | 70,39±3,20 <sup>bc</sup>   | 4,39±0,49 <sup>ab</sup>   | 7,58±0,75 <sup>a</sup>    | 0,45±0,03 <sup>b</sup>    | 1,69±0,26 <sup>bcd</sup>   |

Values are mean±SE, n=6

\* Asterisks within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group for each period

<sup>a-e</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets for each period

#### 4.4. Balance of iron

**Table 26** shows the mineral balance of Fe in the three periods (of three days each) of study. In the first period, Fe AA in all problem groups was higher than control group (50,78%), with significant differences ( $p < 0,05$ ) in groups fed probiotic, prebiotics diets and synbiotic 1,2 and 10% diets (from 63,82 to 66,91%). However, groups fed diets containing 4'-GOS 5% showed a lower AA of Fe. All problem groups excreted in faeces amounts of Fe significantly ( $p < 0,05$ ) lower than control group. In the second period, all problem groups showed an AA of Fe higher than control group (31,12%) except that fed synbiotic 10% diet (27,21%). Only groups fed prebiotic 5 and 10% diets displayed an AA significantly ( $p < 0,05$ ) higher (67,76 and 63,48%, respectively) respect to control group (31,12%). In this period, all groups excreted the same amount of Fe in faeces (from 0,51 to 0,76 mg/g faeces in groups fed synbiotic and prebiotic 1,2% diets, respectively) than control group (0,53 mg/g faeces), but these differences were significantly ( $p < 0,05$ ) lower in all groups in Fe excreted per day. In the third period, all problem groups showed a Fe AA larger than control group (15,71%), and groups fed prebiotic 10% and synbiotic 1,2 and 10% diets (36,71, 30,32 and 35,14%, respectively) displayed an AA significantly ( $p < 0,05$ ) higher to that of group fed control diet (15,71%). In this last period, all groups excreted a significantly ( $p < 0,05$ ) lower Fe excretion per day than control group, except in group fed probiotic diet (0,83 mg/day).

Due to the fact that Fe urinary losses were low and they did not show significant differences with control group at any period, retention Fe percentages did not present higher differences of 1,2% (group fed synbiotic 10% diet in the first period) than Fe AA values. Thus, the differences found in Fe retention are the same than those observed in Fe AA, with the exception of the third period where only groups fed diets containing 10% of 4'-GOS showed a retention significantly ( $p < 0,05$ ) double (36,47 and 34,89% in diets prebiotic and synbiotic 10%, respectively) to that in control group (15,30%).

It can be concluded that again there were found higher Fe AA and retention percentages in all groups fed infant formula respect to group fed AO4 diet. Differences found between control and problem groups were the same for AA and retention of Fe because urinary Fe excretion did not have almost effect on balance calculations. The only groups showing a Fe AA and retention significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control groups, were those fed prebiotic and synbiotic 10% diets. Fe absorption percentages were decreasing in time because a lower number of groups with values significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group were observed. Moreover, no clear dose-effect relationship of 4'-GOS concentration with Fe AA and retention was found.

There are few studies the literature, which evaluate the effect of GOS on Fe absorption. Nevertheless, other authors have used different NDO to GOS to assess Fe balance. Thus, Delzenne *et al.* (1995) found in young rats fed diet containing 7,8 mg/100 g of Fe and inulin or oligofructose at 10% during 26 days, a Fe retention of 34%. Ohta *et al.* (1995b) in weanling

anemic rats fed a diet containing SCFOS 5% and low Ca content (1,5 mg/100 g) or normal Fe content (3,0 mg/100 g), observed a Fe AA significantly ( $p < 0,05$ ) lower in group fed low Fe content (46,3%) than in that fed normal Fe content (54,4%) not being affected by Mg and Ca balances. More recently, Lopez *et al.* (1998) in a study in rats fed resistant starch, observed that Fe balance increased significantly with an AA of 54% respect to the control (45%).

It can be observed when comparing the results of this study to those described previously, that Fe AA and retention due to 4'-GOS supplementation are lower than for other NDO (inulin, oligofructose and SCFOS), due among other reasons, to the different conditions of mineral balance evaluation, since in the previously described studies rats were anemic, and NDO effect is more intensive than in normal physiological conditions such as in our study. It have also take into account the possible Maillard-reaction products (lysinoalanyne and lactulose) originated during technological process of infant formulas (Sarriá *et al.*, 2000). This compounds have the potential to interact with several minerals and trace elements including Fe (Sarriá and Vaquero, 2001) forming insoluble complexes which decrease their bioavailability. Moreover, proteins damaged as a consequence of the thermal processes may lose some properties associated to the mechanisms of mineral absorption (Pérez-Llamas *et al.*, 1996).

It can be concluded for Fe balance that except in group fed synbiotic 5% diet, all problem groups showed a Fe AA and retention significantly ( $p < 0,05$ ) higher than group fed control diet in any of the three periods. The effect of prebiotic diets was higher than probiotic diet, however the addition of different dietary 4'-GOS concentrations did not show a clear dose-effect trend. The supplementation of probiotics to prebiotic diets forming synbiotic diets neither enhanced Fe absorption respect to prebiotic diets. Groups fed prebiotic and synbiotic 5 and 10% diets were more efficient by showing an AA and retention of Fe significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control diet during the three periods of mineral balance.

**Table 26.** Iron balance

| Period     | Diets          | Apparent absorption (%)    | Retention (%)              | Fecal excretion (mg/g)    | Fecal excretion (mg/d)    | Urinary excretion (mg/mL) | Urinary excretion (mg/d) |
|------------|----------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 8-10 days  | AO4            | 20,77±4,74                 | 20,19±4,76                 | 0,60±0,05                 | 4,83±0,11                 | 1,33±0,16                 | 5,70±0,32                |
|            | Control        | 50,78±2,94                 | 50,56±2,95                 | 0,63±0,06                 | 0,44±0,03                 | 0,66±0,14                 | 2,16±0,45                |
|            | Probiotic      | 63,98±0,54 <sup>*/ac</sup> | 63,85±0,55 <sup>*/ab</sup> | 0,58±0,01 <sup>a</sup>    | 0,26±0,02 <sup>*/a</sup>  | 0,60±0,22 <sup>a</sup>    | 1,28±0,51 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 1,2% | 65,15±2,43 <sup>*/ab</sup> | 64,92±2,49 <sup>*/ab</sup> | 0,51±0,08 <sup>*/ab</sup> | 0,18±0,02 <sup>*/bc</sup> | 0,56±0,088 <sup>a</sup>   | 2,30±0,61 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 5%   | 56,69±1,44 <sup>bc</sup>   | 56,42±1,46 <sup>bc</sup>   | 0,57±0,01 <sup>a</sup>    | 0,27±0,01 <sup>*/a</sup>  | 0,86±0,19 <sup>a</sup>    | 2,70±0,44 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 10%  | 66,91±0,26 <sup>*/a</sup>  | 66,66±0,28 <sup>*/a</sup>  | 0,47±0,02 <sup>*/ab</sup> | 0,17±0,01 <sup>*/c</sup>  | 0,62±0,03 <sup>a</sup>    | 2,48±0,27 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 1,2% | 63,82±3,17 <sup>*/ac</sup> | 63,60±3,17 <sup>*/ab</sup> | 0,64±0,01 <sup>a</sup>    | 0,16±0,03 <sup>*/c</sup>  | 0,16±0,22 <sup>a</sup>    | 2,17±0,067 <sup>a</sup>  |
|            | Synbiotic 5%   | 55,98±2,00 <sup>c</sup>    | 55,08±2,41 <sup>c</sup>    | 0,40±0,03 <sup>*/b</sup>  | 0,16±0,01 <sup>*/c</sup>  | 6,20±4,83 <sup>a</sup>    | 8,98±7,63 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 10%  | 66,02±0,75 <sup>*/a</sup>  | 64,83±0,96 <sup>*/ab</sup> | 0,58±0,02 <sup>a</sup>    | 0,24±0,05 <sup>*/ab</sup> | 240±50 <sup>a</sup>       | 689±61 <sup>a</sup>      |
| 18-20 days | AO4            | 23,68±1,62                 | 21,12±3,50                 | 0,53±0,02                 | 6,02±0,31                 | 1095±95,8                 | 8104±834                 |
|            | Control        | 31,12±3,70                 | 30,85±3,67                 | 0,59±0,04                 | 0,68±0,06                 | 0,86±0,14 <sup>a</sup>    | 2,73±0,52                |
|            | Probiotic      | 32,18±2,80 <sup>cb</sup>   | 32,00±2,79 <sup>cb</sup>   | 0,55±0,02 <sup>a</sup>    | 0,46±0,03 <sup>*/ab</sup> | 0,76±0,053 <sup>a</sup>   | 1,81±0,11 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 1,2% | 45,09±1,54 <sup>*/bc</sup> | 44,78±2,17 <sup>*/bc</sup> | 0,76±0,06 <sup>a</sup>    | 0,40±0,01 <sup>*/a</sup>  | 1,43±0,16 <sup>a</sup>    | 2,81±0,25 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 5%   | 67,76±5,19 <sup>*/a</sup>  | 67,52±5,19 <sup>*/a</sup>  | 0,48±0,17 <sup>a</sup>    | 0,35±0,12 <sup>*/ab</sup> | 1,40±0,29 <sup>a</sup>    | 3,16±0,53 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 10%  | 63,48±0,80 <sup>*/a</sup>  | 63,24±1,51 <sup>*/a</sup>  | 0,62±0,02 <sup>a</sup>    | 0,29±0,07 <sup>*/b</sup>  | 0,71±0,12 <sup>a</sup>    | 2,71±0,72 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 1,2% | 40,44±2,44 <sup>bcd</sup>  | 40,11±2,53 <sup>bcd</sup>  | 0,51±0,01 <sup>a</sup>    | 0,32±0,03 <sup>*/ab</sup> | 3,83±2,43 <sup>a</sup>    | 3,28±1,11 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 5%   | 27,21±4,05 <sup>d</sup>    | 26,43±4,47 <sup>d</sup>    | 0,61±0,05 <sup>a</sup>    | 0,39±0,02 <sup>*/ab</sup> | 6,01±3,75 <sup>a</sup>    | 7,78±5,77 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 10%  | 53,28±2,91 <sup>*/ab</sup> | 52,91±2,83 <sup>*/ab</sup> | 0,68±0,09 <sup>a</sup>    | 0,45±0,02 <sup>*/a</sup>  | 602±110 <sup>a</sup>      | 2160±429 <sup>a</sup>    |
| 28-30 days | AO4            | 14,44±3,80                 | 13,87±3,82                 | 0,63±0,02                 | 7,32±0,41                 | 788±131                   | 6025±664                 |
|            | Control        | 15,71±0,81                 | 15,30±1,28                 | 0,53±0,02                 | 1,04±0,06                 | 0,58±0,069                | 3,37±1,00                |
|            | Probiotic      | 17,09±2,98 <sup>b</sup>    | 16,15±3,36 <sup>b</sup>    | 0,51±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,83±0,03 <sup>a</sup>    | 3,47±2,57 <sup>a</sup>    | 9,34±6,26 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 1,2% | 22,27±2,63 <sup>a</sup>    | 22,15±2,58 <sup>ab</sup>   | 0,53±0,05 <sup>ab</sup>   | 0,77±0,08 <sup>*/ab</sup> | 0,32±0,22 <sup>a</sup>    | 1,18±0,73 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 5%   | 24,23±5,19 <sup>ab</sup>   | 23,41±5,70 <sup>ab</sup>   | 0,54±0,03 <sup>a</sup>    | 0,78±0,08 <sup>*/ab</sup> | 0,21±1,28 <sup>a</sup>    | 6,57±3,69 <sup>a</sup>   |
|            | Prebiotic 10%  | 36,71±2,97 <sup>*/a</sup>  | 36,47±3,00 <sup>*/a</sup>  | 0,55±0,07 <sup>a</sup>    | 0,60±0,06 <sup>*/ac</sup> | 0,61±0,06 <sup>a</sup>    | 2,41±0,50 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 1,2% | 30,32±3,90 <sup>*/ab</sup> | 29,44±3,98 <sup>ab</sup>   | 0,21±0,01 <sup>*/b</sup>  | 0,48±0,05 <sup>*/c</sup>  | 0,75±0,18 <sup>a</sup>    | 1,73±0,20 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 5%   | 25,14±2,00 <sup>ab</sup>   | 24,36±2,24 <sup>ab</sup>   | 0,38±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,53±0,01 <sup>*/bc</sup> | 2,60±0,79 <sup>a</sup>    | 7,78±3,53 <sup>a</sup>   |
|            | Synbiotic 10%  | 35,14±2,99 <sup>*/a</sup>  | 34,89±2,98 <sup>*/ab</sup> | 0,45±0,08 <sup>ab</sup>   | 0,75±0,01 <sup>*/ac</sup> | 6,64±0,07 <sup>a</sup>    | 2,52±0,55 <sup>a</sup>   |

Values are mean±SE, n=6

\* Asterisks within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group for each period

<sup>a-d</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets for each period

## 5. Effect on cecum and colon of rats

### 5.1. Cecal and colonic parameters (weight and pH)

**Table 27** shows the following parameters measured in cecum: total weight, wall weight, pH and weight of the content, and liquid and solid phase weights after centrifuging. The supplementation with probiotics and/or prebiotics did not modify significantly neither total nor content cecal weights. However, wall cecal weight increased in group fed prebiotic 10% diet (1,58 g), representing an increase of 1/3 of that in control group. Groups fed prebiotic 10% and synbiotic 5 and 10% diets showed a higher total, wall and content weights of the cecum although no differences were observed with control group. Groups fed synbiotic diets displayed a significant ( $p < 0,05$ ) lower pH of cecal content (5,14, 5,12 and 5,13, respectively) than control group (5,60). Solid phase weight did not show statistical differences between problem groups and control group (0,29 g). However, groups fed prebiotic 10% diet and synbiotic diets displayed a significantly ( $p < 0,05$ ) higher weight of the liquid phase (from 3,28 g in synbiotic 1,2% diet to 3,70 g in prebiotic 10% diet) comparing to group fed control diet (2,91 g).

**Table 27.** Cecal parameters in rats fed experimental diets for 30 days

| Diets                 | Total weight (g)        | Wall weight (g)          | Cecal content weight (g) | Cecal content pH         | Liquid phase weight (g)  | Solid phase weight (g) |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>AO4</b>            | 5,94±0,92               | 1,20±0,17                | 4,74±0,80                | 5,95±0,09                | 4,12±0,02                | 0,62±0,02              |
| <b>Control</b>        | 4,24±0,53               | 1,02±0,08                | 3,21±0,49                | 5,60±0,09                | 2,91±0,04                | 0,29±0,03              |
| <b>Probiotic</b>      | 4,22±0,18 <sup>ab</sup> | 1,04±0,05 <sup>b</sup>   | 3,18±0,16 <sup>ab</sup>  | 5,67±0,07 <sup>a</sup>   | 2,88±0,02 <sup>c</sup>   | 0,30±0,02 <sup>a</sup> |
| <b>Prebiotic 1,2%</b> | 3,51±0,38 <sup>b</sup>  | 1,00±0,11 <sup>b</sup>   | 2,50±0,30 <sup>b</sup>   | 5,50±0,09 <sup>ab</sup>  | 2,28±0,03 <sup>*/d</sup> | 0,22±0,03 <sup>a</sup> |
| <b>Prebiotic 5%</b>   | 3,38±0,39 <sup>b</sup>  | 0,99±0,05 <sup>b</sup>   | 2,40±0,36 <sup>b</sup>   | 5,40±0,14 <sup>ab</sup>  | 2,22±0,01 <sup>*/d</sup> | 0,17±0,01 <sup>a</sup> |
| <b>Prebiotic 10%</b>  | 5,52±0,37 <sup>a</sup>  | 1,58±0,27 <sup>*/a</sup> | 3,94±0,35 <sup>ab</sup>  | 5,42±0,09 <sup>ab</sup>  | 3,70±0,06 <sup>*/a</sup> | 0,23±0,06 <sup>a</sup> |
| <b>Synbiotic 1,2%</b> | 4,51±0,33 <sup>ab</sup> | 0,95±0,10 <sup>b</sup>   | 3,56±0,36 <sup>ab</sup>  | 5,14±0,06 <sup>*/b</sup> | 3,28±0,06 <sup>*/b</sup> | 0,25±0,06 <sup>a</sup> |
| <b>Synbiotic 5%</b>   | 5,39±0,35 <sup>a</sup>  | 1,36±0,02 <sup>ab</sup>  | 4,03±0,34 <sup>a</sup>   | 5,12±0,08 <sup>*/b</sup> | 3,69±0,06 <sup>*/a</sup> | 0,34±0,06 <sup>a</sup> |
| <b>Synbiotic 10%</b>  | 5,40±0,78 <sup>a</sup>  | 1,37±0,09 <sup>ab</sup>  | 4,03±0,74 <sup>ab</sup>  | 5,13±0,07 <sup>*/b</sup> | 3,67±0,01 <sup>*/a</sup> | 0,36±0,01 <sup>a</sup> |

Values are mean±SE, n=6

\* within the same column shows significant differences ( $p < 0,05$ ) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-d</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test ( $p < 0,05$ ) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

**Table 28** shows the following parameters measured in colon: total weight, wall weight, pH and weight of the content, and phase liquid and solid weights after centrifuging. As in the cecum, neither total nor content colon weights in problem groups displayed significant differences respect to control group. However, wall colonic weight in groups fed synbiotic 1,2 and 5% showed the lowest values (0,49 and 0,61 g, respectively). Group fed prebiotic 10% diet displayed a larger total and wall colonic weights (1,51 and 0,85 g, respectively), and group fed probiotic diet showed a higher total and content colonic weights (1,57 and 0,84 g, respectively) among problem groups. With regard to pH content of the colon, also groups fed synbiotic diets showed the significant ( $p < 0,05$ ) lowest pH values (5,25, 5,21 and 5,26, respectively) and that fed prebiotic 5% diet (5,36) than control group (5,77). Except solid phase in group fed synbiotic

10% diet (0,33 g), no problem group showed significant differences ( $p < 0,05$ ) according to solid and liquid phases of colonic content respect to control group (0,17 and 0,41 g, respectively).

**Table 28.** Colonic parameters in rats fed experimental diets for 30 days

| Diets          | Total weight (g)        | Wall weight (g)           | Colonic content weight (g) | Colonic content pH       | Liquid phase weight (g) | Solid phase weight (g)   |
|----------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| AO4            | 3,83±0,45               | 1,55±0,07                 | 2,28±0,45                  | 5,98±0,06                | 1,74±0,10               | 0,54±0,10                |
| Control        | 1,40±0,15               | 0,85±0,06                 | 0,58±0,10                  | 5,77±0,15                | 0,41±0,01               | 0,17±0,01                |
| Probiotic      | 1,57±0,11 <sup>a</sup>  | 0,72±0,03 <sup>ab</sup>   | 0,84±0,10 <sup>a</sup>     | 5,51±0,12 <sup>a</sup>   | 0,63±0,03 <sup>a</sup>  | 0,21±0,03 <sup>a</sup>   |
| Prebiotic 1,2% | 1,42±0,11 <sup>ab</sup> | 0,79±0,08 <sup>ab</sup>   | 0,63±0,07 <sup>a</sup>     | 5,53±0,15 <sup>a</sup>   | 0,49±0,02 <sup>ab</sup> | 0,13±0,03 <sup>a</sup>   |
| Prebiotic 5%   | 1,42±0,10 <sup>ab</sup> | 0,66±0,03 <sup>abc</sup>  | 0,76±0,08 <sup>a</sup>     | 5,36±0,07 <sup>*/a</sup> | 0,54±0,03 <sup>ab</sup> | 0,22±0,02 <sup>a</sup>   |
| Prebiotic 10%  | 1,51±0,16 <sup>a</sup>  | 0,85±0,07 <sup>a</sup>    | 0,69±0,14 <sup>a</sup>     | 5,42±0,08 <sup>a</sup>   | 0,52±0,07 <sup>ab</sup> | 0,16±0,07 <sup>a</sup>   |
| Synbiotic 1,2% | 0,93±0,10 <sup>b</sup>  | 0,49±0,05 <sup>*/c</sup>  | 0,43±0,07 <sup>a</sup>     | 5,25±0,04 <sup>*/a</sup> | 0,29±0,03 <sup>b</sup>  | 0,13±0,03 <sup>a</sup>   |
| Synbiotic 5%   | 1,25±0,11 <sup>ab</sup> | 0,61±0,04 <sup>*/bc</sup> | 0,64±0,08 <sup>a</sup>     | 5,21±0,07 <sup>*/a</sup> | 0,42±0,06 <sup>ab</sup> | 0,22±0,06 <sup>a</sup>   |
| Synbiotic 10%  | 1,44±0,18 <sup>ab</sup> | 0,70±0,03 <sup>ac</sup>   | 0,74±0,17 <sup>a</sup>     | 5,26±0,08 <sup>*/a</sup> | 0,41±0,13 <sup>ab</sup> | 0,33±0,13 <sup>*/a</sup> |

Values are mean±SE, n=6

\* within the same column shows significant differences ( $p < 0,05$ ) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-c</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test ( $p < 0,05$ ) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

It can be concluded that only the group fed prebiotic 10% diet increased significantly ( $p < 0,05$ ) the wall cecal weight and those fed synbiotic diets reduced significantly ( $p < 0,05$ ) pH content of cecum and colon respect with control group. In regard to liquid phase of cecal content, groups fed synbiotic diets and prebiotic 10% diet increased significantly ( $p < 0,05$ ) the weight of this phase, where presumably minerals are found to be absorbed by the epithelial cells in the large intestine.

All studies agree that there is a significant decrease ( $p < 0,05$ ) in pH of cecal content after NDO dietetic administration. Thus, Ohta *et al.* (1993) observed that diets containing 5% of GOS, raffinose or SCFOS decreased significantly ( $p < 0,05$ ) pH of cecal content (5,62, 5,54 and 5,24, respectively) than control group (6,88) in rats. Moreover, NDO and Ca concentrations in diet influence on the pH of large intestine content. Chonan and Watanuki (1995) found a pH of cecal content in rats of 5,6 when 5% of TOS were administered, and a value of 5,3 with 10% of TOS. The same researchers (Chonan and Watanuki, 1996) described that the consumption by rats of a diet containing 5% of 6'-GOS with low Ca content (215 mg Ca/100 g) led to a lower pH of the cecal content (5,80) comparing to the pH reached (6,04) by the group fed the diet with normal Ca content (2.150 mg Ca/100g). Révész *et al.* (1993) in rats fed diet containing 300 mg/100 g or 800 mg/100 g of Ca supplemented with 15% of inulin, also found a significant ( $p < 0,05$ ) lower pH in the group fed the lower Ca content (5,30) than the other group (5,9).

Lopez *et al.* (1998) did not observed significant differences in wall cecal weight using resistant and no-resistant starch as carbohydrates source. Nevertheless, other results have been observed using other resistant carbohydrates, such as described by Chonan *et al.* (2001) who observed in rats fed 4'-GOS 5% an increase in total and wall cecal weights. However, in a previous study Chonan and Watanuki (1995) found a significant greater wall cecal weight only in group fed TOS 10%, as in our study using 4'-GOS as NDO.

As in our work and using other NDO, Campbell *et al.* (1997) neither found significant differences in total and wall colonic weights respect to control group in rats fed a diet containing cellulose, SCFOS, oligofructose or XOS at 6%.

The effect of probiotics on cecum and colon parameters regarding mineral absorption is little studied. Djouzi *et al.* (1997) described that probiotics administration decreased significantly ( $p < 0,05$ ) pH of cecal content in free germ rats fed a diet with 30% of fermented milk containing *L. casei*. However, and as in our study, they did not find significant changes in total cecal weight after four weeks of study.

pH content of the colon is not commonly measured since the lack interest of this place from a fermentative point of view. However, Ohta *et al.* (1994b) in a study with laparotomized rats and fed a diet containing 5% of SCFOS, described a pH of cecal and colonic contents of 5,36 and 5,7 respectively. As in our study, pH found in colonic content was higher than in cecal content, because contrary to man, rat is a specie where the fermentation occurs mainly in the cecum (Campbell *et al.*, 1997).

We found a significant increase in the liquid phase of cecal content in groups fed prebiotic 10% diet and synbiotic diets. This finding has been also described by other authors by means of using resistant starch (Schultz *et al.*, 1993), arabinoxylans and guar gum (Lu *et al.*, 2000) and TGOS (Chonan and Watanuki, 1995). It has been reported that this fact could have a direct effect on mineral absorption and more concretely on Ca absorption, since this fluid might enlarge passive absorption of Ca by increasing the permeability of the intercellular junction between enterocytes (Bronner, 1987).

Concluding, groups fed synbiotic diets showed a pH cecal content significantly ( $p < 0,05$ ) lower than control group and a liquid phase weight of cecal content in these same groups and that fed prebiotic 10% diet significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group. In the colon, again groups fed synbiotic diets and prebiotic 5% diet displayed a pH colonic content significantly ( $p < 0,05$ ) lower than group fed control diet.

## **5.2. Mineral distribution in the liquid and solid phase of cecal and colonic contents**

In **Table 29** is shown the mineral distribution (Ca, Mg, P and Fe) in liquid and solid phases of cecal and colonic contents expressed as mg of mineral/content. All minerals exhibited a higher content in solid phase. Mineral content in liquid phase, place where minerals are in soluble form, both in cecal and colonic contents in general did not show significant differences with control group. Only in liquid phase of cecal content Fe concentration of groups fed prebiotic and synbiotic 10% diets were significantly ( $p < 0,05$ ) larger (0,102 and 0,07 mg Fe, respectively) than control group (0,024 mg Fe).

Practically all problem groups showed a mineral percentage in the cecal liquid phase with no differences respecting control group. However, Fe percentage in colonic liquid phase of groups fed prebiotic 5 and 10% diets (13,66 and 15,31%, respectively) displayed significantly

( $p < 0,05$ ) higher values than control group (5,15%). Moreover, group fed prebiotic 5% diet showed a Mg percentage in cecal liquid phase (95,50%) significantly ( $p < 0,05$ ) larger than control group (59,22%). The higher percentages were observed in Ca and Mg, suggesting that in cecal content was solubilized and important amount of these minerals. Regarding to colon, the percentages of Ca and Mg solubilized was slightly lower than previously, but also slightly higher for Fe and P, suggesting that these two minerals are absorbed in a great extent in the colon. Only group fed prebiotic 10% diet showed a Ca percentage in colonic liquid phase significantly ( $p < 0,05$ ) higher (61,66%) than control group (10,86%). Finally, point that both in cecum and colon the scarce P percentage found in the liquid phase comparing to the other minerals, because probably it is forming any complex (Brink *et al.*, 1992) which avoid its correct measurement since intestinal absorption of P was high as it was shown previously in the P balance.

Ohta *et al.* (1995b), observed that Fe concentration in the liquid phase of cecal content was significantly higher in group fed SCFOS 5% than in control group, and like in our work no differences were found in Ca and Mg contents in cecal liquid phase. Fe was the only mineral showing a significant ( $p < 0,05$ ) higher percentage in groups fed prebiotic 5 and 10% diets with respect to control group. No differences in Ca, Mg and P percentages were found respecting control group except in those fed prebiotic and synbiotic 5% diet for Mg. It have been also observed that mineral concentration in the diet affects its concentration in the liquid phase of cecal content. Thus, Younes *et al.* (1996) found in rats fed resistant starch soluble Ca percentage in cecal content was of 49% with a low Ca content diet (250 mg/100 g), opposite to a 16% with a diet containing higher Ca content (750 mg/100 g). In our study, although the amount of Ca used was intermediate (572 mg/100 g) to that used by Younes *et al.*, the percentages we obtained were more similar to those reported in the group fed the lower Ca content.

### 5.3. Epithelial cell proliferation in cecal and colonic mucosa of rats

**Table 30** shows the crypt depth and cellular density per crypt of the cecal and colonic wall (proximal and distal). In cecum were not appreciated differences in crypt depth and cell density. In colon, all problem groups showed a crypt depth significantly ( $p < 0,05$ ) higher (from 342,22  $\mu\text{m}$  in probiotic diet to 448  $\mu\text{m}$  in synbiotic 1,2% diet) than control group (300,23  $\mu\text{m}$ ) in the proximal portion. Regarding cell density, groups fed probiotic, prebiotic 1,2 and 10%, and synbiotic 5% diets (from 30,0 cells in prebiotic 1,2% diet to 32,89 cells in probiotic diet) displayed a significant ( $p < 0,05$ ) larger number of cells per crypt than control group (26,50 cells). In distal colon, all problem groups showed a significant ( $p < 0,05$ ) deeper crypts (from 347,39 in synbiotic 1,2% diet to 395,12  $\mu\text{m}$  in synbiotic 10% diet) than control group (316,84  $\mu\text{m}$ ).

Groups fed prebiotic 1,2 and 5% diets and synbiotic 5 and 10% diets showed a cell density significantly ( $p < 0,05$ ) higher (from 28,43 cells in prebiotic 5% diet to 32,33 cells in synbiotic 10% diet) than group fed control diet (25,57 cells).

**Table 29.** Distribution of calcium, magnesium, phosphorus and iron between the liquid and solid phase in the cecal and colonic contents of rats fed experimental diets for 30 days

|                                | AO4         | Control     | Probiotic                | Prebiotic 1,2%            | Prebiotic 5%               | Prebiotic 10%              | Synbiotic 1,2%            | Synbiotic 5%               | Synbiotic 10%               |
|--------------------------------|-------------|-------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>CECUM</b>                   |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| <b>Calcium</b>                 |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 14,80±1,32  | 9,95±2,13   | 11,75±0,95 <sup>a</sup>  | 7,12±2,75 <sup>ab</sup>   | 5,79±0,27 <sup>b</sup>     | 5,50±0,37 <sup>b</sup>     | 4,59±0,93 <sup>b</sup>    | 9,09±0,39 <sup>ab</sup>    | 6,72±0,75 <sup>ab</sup>     |
| In liquid phase                | 2,20±0,02   | 2,68±0,610  | 1,20±0,06 <sup>a</sup>   | 2,12±0,03 <sup>a</sup>    | 3,57±0,45 <sup>a</sup>     | 2,55±0,59 <sup>a</sup>     | 2,64±0,99 <sup>a</sup>    | 3,50±0,97 <sup>a</sup>     | 3,38±0,31 <sup>a</sup>      |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 13,08±0,89  | 21,23±1,06  | 9,33±0,82 <sup>b</sup>   | 27,66±8,26 <sup>ab</sup>  | 37,92±3,19 <sup>a</sup>    | 30,94±4,44 <sup>ab</sup>   | 37,38±6,95 <sup>ab</sup>  | 26,68±5,21 <sup>ab</sup>   | 33,67±2,60 <sup>ab</sup>    |
| <b>Magnesium</b>               |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 1,07±0,10   | 0,27±0,03   | 0,19±0,01 <sup>a</sup>   | 0,16±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,02±0,00 <sup>b</sup>     | 0,20±0,01 <sup>*/a</sup>   | 0,36±0,03 <sup>*/a</sup>  | 0,16±0,02 <sup>ab</sup>    | 0,18±0,03 <sup>ab</sup>     |
| In liquid phase                | 1,36±0,19   | 0,43±0,12   | 0,34±0,02 <sup>a</sup>   | 0,47±0,14 <sup>a</sup>    | 0,47±0,06 <sup>a</sup>     | 0,33±0,11 <sup>a</sup>     | 0,52±0,14 <sup>a</sup>    | 0,68±0,15 <sup>a</sup>     | 0,60±0,06 <sup>a</sup>      |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 55,69±2,57  | 59,22±4,78  | 64,44±1,06 <sup>bc</sup> | 75,24±5,59 <sup>abc</sup> | 95,50±0,34 <sup>*/a</sup>  | 60,12±5,32 <sup>bc</sup>   | 56,90±6,63 <sup>c</sup>   | 79,14±4,80 <sup>*/ab</sup> | 76,66±1,61 <sup>abc</sup>   |
| <b>Phosphorus</b>              |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 9,62±0,55   | 2,00±0,48   | 2,63±0,35 <sup>a</sup>   | 2,68±0,96 <sup>a</sup>    | 1,88±0,15 <sup>a</sup>     | 1,74±0,17 <sup>a</sup>     | 1,54±0,30 <sup>a</sup>    | 2,94±0,24 <sup>a</sup>     | 2,60±0,40 <sup>a</sup>      |
| In liquid phase                | 0,050±0,001 | 0,041±0,005 | 0,044±0,001 <sup>a</sup> | 0,061±0,022 <sup>a</sup>  | 0,033±0,004 <sup>a</sup>   | 0,048±0,005 <sup>a</sup>   | 0,033±0,009 <sup>a</sup>  | 0,041±0,004 <sup>a</sup>   | 0,042±0,004 <sup>a</sup>    |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 0,52±0,04   | 2,21±0,41   | 1,73±0,25 <sup>ab</sup>  | 2,19±0,20 <sup>ab</sup>   | 1,71±0,09 <sup>ab</sup>    | 2,72±0,40 <sup>a</sup>     | 2,02±0,31 <sup>ab</sup>   | 1,40±0,23 <sup>b</sup>     | 1,63±0,25 <sup>ab</sup>     |
| <b>Iron</b>                    |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 1,08±0,08   | 0,42±0,05   | 0,33±0,04 <sup>c</sup>   | 0,29±0,05 <sup>c</sup>    | 0,24±0,02 <sup>c</sup>     | 0,58±0,07 <sup>ab</sup>    | 0,21±0,02 <sup>*/c</sup>  | 0,43±0,01 <sup>abc</sup>   | 0,64±0,08 <sup>*/a</sup>    |
| In liquid phase                | 0,022±0,006 | 0,024±0,007 | 0,023±0,005 <sup>c</sup> | 0,026±0,008 <sup>c</sup>  | 0,038±0,005 <sup>bc</sup>  | 0,102±0,002 <sup>*/a</sup> | 0,027±0,002 <sup>c</sup>  | 0,014±0,008 <sup>c</sup>   | 0,070±0,013 <sup>*/ab</sup> |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 2,11±0,76   | 5,15±0,96   | 6,58±1,31 <sup>bc</sup>  | 7,82±1,17 <sup>abc</sup>  | 13,66±1,25 <sup>*/ab</sup> | 15,31±1,40 <sup>*/a</sup>  | 11,65±1,78 <sup>ab</sup>  | 3,19±1,78 <sup>c</sup>     | 10,42±2,61 <sup>abc</sup>   |
| <b>COLON</b>                   |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| <b>Calcium</b>                 |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 7,44±0,51   | 5,96±1,26   | 9,63±0,08 <sup>*/a</sup> | 3,03±0,65 <sup>*/bc</sup> | 9,34±0,93 <sup>*/a</sup>   | 0,98±0,09 <sup>*/c</sup>   | 3,14±0,31 <sup>bc</sup>   | 3,75±0,46 <sup>c</sup>     | 5,31±0,82 <sup>b</sup>      |
| In liquid phase                | 1,33±0,12   | 1,16±0,06   | 1,17±0,03 <sup>a</sup>   | 1,28±0,08 <sup>a</sup>    | 2,90±0,41 <sup>a</sup>     | 2,13±0,94 <sup>a</sup>     | 2,09±1,10 <sup>a</sup>    | 1,37±0,71 <sup>a</sup>     | 1,46±0,13 <sup>a</sup>      |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 15,34±2,08  | 17,79±4,43  | 10,86±0,19 <sup>b</sup>  | 30,86±4,30 <sup>ab</sup>  | 23,56±0,93 <sup>b</sup>    | 61,66±12,21 <sup>*/a</sup> | 35,60±11,67 <sup>ab</sup> | 23,48±9,76 <sup>b</sup>    | 21,85±1,16 <sup>b</sup>     |
| <b>Magnesium</b>               |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 1,71±0,29   | 0,25±0,04   | 0,34±0,01 <sup>a</sup>   | 0,15±0,01 <sup>b</sup>    | 0,27±0,03 <sup>a</sup>     | 0,10±0,00 <sup>*/bc</sup>  | 0,08±0,04 <sup>*/c</sup>  | 0,13±0,05 <sup>*/b</sup>   | 0,26±0,09 <sup>a</sup>      |
| In liquid phase                | 1,03±0,02   | 0,48±0,08   | 0,20±0,03 <sup>a</sup>   | 0,46±0,06 <sup>a</sup>    | 0,45±0,09 <sup>a</sup>     | 0,50±0,33 <sup>a</sup>     | 0,41±0,02 <sup>a</sup>    | 0,59±0,37 <sup>a</sup>     | 0,44±0,12 <sup>a</sup>      |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 38,40±3,78  | 65,82±0,83  | 37,22±3,63 <sup>b</sup>  | 75,23±2,12 <sup>ab</sup>  | 61,08±4,54 <sup>ab</sup>   | 69,46±13,68 <sup>ab</sup>  | 84,63±6,72 <sup>a</sup>   | 68,11±14,45 <sup>ab</sup>  | 60,58±6,40 <sup>ab</sup>    |
| <b>Phosphorus</b>              |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 4,84±0,90   | 2,26±0,68   | 3,17±0,75 <sup>a</sup>   | 1,32±0,27 <sup>bc</sup>   | 2,48±0,25 <sup>ab</sup>    | 0,51±0,27 <sup>*/c</sup>   | 1,10±0,01 <sup>bc</sup>   | 1,07±0,03 <sup>bc</sup>    | 1,93±0,01 <sup>abc</sup>    |
| In liquid phase                | 0,03±0,00   | 0,10±0,02   | 0,03±0,00 <sup>a</sup>   | 0,10±0,03 <sup>a</sup>    | 0,08±0,01 <sup>a</sup>     | 0,06±0,03 <sup>a</sup>     | 0,09±0,02 <sup>a</sup>    | 0,03±0,00 <sup>a</sup>     | 0,11±0,01 <sup>a</sup>      |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 0,64±0,15   | 4,81±1,42   | 1,14±0,21 <sup>b</sup>   | 6,58±1,26 <sup>ab</sup>   | 2,99±0,19 <sup>ab</sup>    | 9,18±2,59 <sup>a</sup>     | 7,66±2,17 <sup>ab</sup>   | 3,07±0,74 <sup>ab</sup>    | 5,56±0,17 <sup>ab</sup>     |
| <b>Iron</b>                    |             |             |                          |                           |                            |                            |                           |                            |                             |
| In solid phase                 | 0,76±0,17   | 0,38±0,12   | 0,34±0,08 <sup>ab</sup>  | 0,28±0,06 <sup>ab</sup>   | 0,48±0,05 <sup>a</sup>     | 0,14±0,08 <sup>b</sup>     | 0,11±0,01 <sup>b</sup>    | 0,14±0,02 <sup>b</sup>     | 0,32±0,05 <sup>ab</sup>     |
| In liquid phase                | 0,033±0,024 | 0,031±0,017 | 0,016±0,012 <sup>a</sup> | 0,046±0,007 <sup>a</sup>  | 0,021±0,000 <sup>a</sup>   | 0,039±0,015 <sup>a</sup>   | 0,025±0,001 <sup>a</sup>  | 0,041±0,031 <sup>a</sup>   | 0,044±0,012 <sup>a</sup>    |
| % in liquid phase <sup>f</sup> | 3,41±1,87   | 6,60±1,61   | 5,38±4,46 <sup>a</sup>   | 15,52±4,76 <sup>a</sup>   | 4,34±0,45 <sup>a</sup>     | 25,25±8,17 <sup>a</sup>    | 19,05±1,12 <sup>a</sup>   | 18,62±11,78 <sup>a</sup>   | 13,11±4,91 <sup>a</sup>     |

Values are mean±SE, n=6

\* Asterisks within the same row shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-c</sup> Means with unlike superscript letter in the same row are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

<sup>φ</sup> (mineral content in liquid phase) / [( mineral content in liquid phase) + (mineral content in solid phase)] x 100, mineral content is expressed as mg

The results showed that the addition of bifidobacteria and/or 4'-GOS to diets did not have any effect on morphology of cecal epithelium at least in the apex portion. However, crypt depth was significantly affected in all groups in the colon, and cell density was significantly affected in groups fed probiotic, prebiotic 1,2 and 10% and synbiotic 5% diets in proximal colon, and in groups fed prebiotic 1,2 and 5% and synbiotic 5 and 10% diets in distal colon.

Groups fed prebiotic 5% and synbiotic 1,2 and 10% diets displayed a crypt depth significantly ( $p < 0,05$ ) higher than control group in proximal colon but no differences were observed in cellular density. This effect was also showed in distal colon in groups fed probiotic, prebiotic 10% and synbiotic 1,2%. This fact involves an increase in cell volume of epithelial crypts cells of described groups, that has been explained in cell lines of rat colon due to the SCFA produced on intestinal lumen are absorbed by colonocytes inducing an acidification of the cells. For recovering intracellular pH, cells have multiple processes including  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and  $\text{H}^+/\text{AGCC}$  cotransport inducing a cell swelling (Diener *et al.*, 1993).

In man, the fermentation of carbohydrates which escape to the enzymatic hydrolysis in the small intestine occurs mainly in ascending colon due to the higher availability of substrates, higher bacterial growth and more acidic pH (Cummings and Macfarlane, 1991). In our study the fact that colon mucosa has experimented changes both in proximal and distal portions, indicates that diets have provided an amount sufficiently large of 4'-GOS to be fermented in both portions.

The data found in the scientific bibliography on epithelium morphology in large intestine are different according to NDO used. Howard *et al.* (1995a) in a study with young rats fed 3% of SCFOS, XOS or gum arabic, observed that only the group fed gum arabic showed a crypt depth in cecum and colon significant ( $p < 0,05$ ) higher than control group, and no NDO stimulated cell density. Tashiro *et al.* (1997) in rats fed 5% of SCFOS, nystose, inulin, guar gum or cellulose, only found significant differences in cell density of cecal crypts (25 in group fed control diet and 30 in those fed inulin and guar gum containing diets), but not in proximal and distal colon. However, our results agree with those described by Howard *et al.* (1995b) who fed neonatal pigs with FOS at 0,3% and found an increase in crypt depth and cell proliferation in proximal and distal colon, but not in cecum.

It has been also described that Ca concentration might affect mucosa cell proliferation in the large intestine. Thus, Rémésy *et al.* (1993) observed that after 15% inulin administration, cecal crypt depth and cell density were significantly ( $p < 0,05$ ) higher (320  $\mu\text{m}$  and 63, respectively) in group fed diet containing 800 mg Ca/100 g than that fed 300 mg Ca/100 g.

**Table 30.** Morphological measurements of cecal and colonic mucosa of rats fed experimental diets for 30 days

| Diets          | CECUM                      |                          | PROXIMAL COLON              |                             | DISTAL COLON                |                            |
|----------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                | Crypts height (mm)         | Cell density             | Crypts height (mm)          | Cell density                | Crypts height (mm)          | Cell density               |
| AO4            | 316,38±6,77                | 26,75±1,03               | 400,68±3,18                 | 32,80±1,02                  | 338,58±10,17                | 34,28±0,68                 |
| Control        | 404,30±1,48                | 25,20±0,86               | 300,23±14,38                | 26,50±0,29                  | 316,84±5,62                 | 25,57±0,81                 |
| Probiotic      | 408,18±5,01 <sup>b</sup>   | 28,14±0,74 <sup>a</sup>  | 342,22±11,33 <sup>d/*</sup> | 32,89±0,65 <sup>a/*</sup>   | 376,23±7,04 <sup>a/*</sup>  | 25,33±0,41 <sup>d</sup>    |
| Prebiotic 1,2% | 448,52±5,01 <sup>a</sup>   | 27,80±0,92 <sup>a</sup>  | 386,76±6,61 <sup>c/*</sup>  | 30,00±0,84 <sup>ab/*</sup>  | 393,33±8,03 <sup>a/*</sup>  | 29,14±0,46 <sup>b/*</sup>  |
| Prebiotic 5%   | 366,92±6,91 <sup>c</sup>   | 27,50±0,29 <sup>a</sup>  | 406,64±5,58 <sup>bc/*</sup> | 29,43±0,37 <sup>b</sup>     | 375,25±11,43 <sup>a/*</sup> | 28,43±0,37 <sup>bc/*</sup> |
| Prebiotic 10%  | 358,74±15,08 <sup>bc</sup> | 27,14±0,55 <sup>a</sup>  | 417,16±4,84 <sup>ab/*</sup> | 30,17±1,75 <sup>abc/*</sup> | 397,90±11,41 <sup>a/*</sup> | 25,60±0,68 <sup>cd</sup>   |
| Synbiotic 1,2% | 397,21±0,83 <sup>b</sup>   | 25,25±1,84 <sup>ab</sup> | 448,72±7,74 <sup>a/*</sup>  | 25,67±0,56 <sup>c</sup>     | 347,39±7,94 <sup>a/*</sup>  | 27,29±0,56 <sup>bcd</sup>  |
| Synbiotic 5%   | 382,87±11,68 <sup>bc</sup> | 23,14±0,70 <sup>b</sup>  | 388,90±8,44 <sup>bc/*</sup> | 31,37±0,36 <sup>ab/*</sup>  | 395,12±7,78 <sup>a/*</sup>  | 31,33±1,12 <sup>ab/*</sup> |
| Synbiotic 10%  | 380,28±5,75 <sup>bc</sup>  | 25,67±0,33 <sup>ab</sup> | 383,08±7,21 <sup>cd/*</sup> | 30,10±0,38 <sup>b</sup>     | 372,94±8,20 <sup>a/*</sup>  | 32,33±0,33 <sup>a/*</sup>  |

Values are mean±SE, n=6

\* Asterisks within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-d</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

## 6. Effect on mineral content of the femur and tibia in rats

Mineral bone structure is mainly constituted by hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ) (Rasmussen and Bordier, 1974), however bones are also composed by Mg (Rude, 1996). On the contrary, Fe is mainly forming part of hemoglobin (Hb), mioglobin (Mb) and some enzymes, however up to 30% is placed in bone marrow (NCR, 1991; Czajka, 1996). Evaluation of Hb Fe is usually regarded as the reference standard for assessment of Fe stores (Holyoake *et al.*, 1993). Therefore, in **Table 31** is shown dry weight, ash content and mineral content (Ca, Mg, P and Fe), expressed in mg of mineral/g of dry weight bone, of the femur in rats after mineral balance. All problem groups showed a significant (p<0,05) less weighty femur (from 282,25 mg in synbiotic 1,2% diet to 304,13 mg in prebiotic 5% diet) than control group (349,60 mg), and group fed synbiotic 1,2% diet displayed the lightest femur. Regarding ash content, groups fed prebiotic diets did not show differences with control group (57,24%). Ca content in femur of all problem groups was significantly (p<0,05) higher (from 181,07 mg in probiotic diet to 206,78 mg in synbiotic 5% diet) respect to control group (156,03 mg). Groups fed prebiotic 1,2% and synbiotic 1,2 and 5% diets presented the highest percentages (197,67, 196,74 and 206,78 mg, respectively). Mg content in femur of problem groups were not higher than control group (1,82 mg), and groups fed prebiotic diets was significantly (p<0,05) lower (1,63, 1,62 and 1,6 mg, respectively). However, P content in femur was significantly (p<0,05) higher in groups fed prebiotic diets and synbiotic 1,2 and 10% diets (from 106,05 in prebiotic 5% diet to 108,74 mg in prebiotic 1,2% diet) than control group (103,56 mg). Fe content in femur was only significantly (p<0,05) higher in group fed synbiotic 5% diet (7,70 mg) than in group fed control diet (5,71 mg).

We conclude that no problem group showed a femur more weighty than control group, possibly due to its development was more related to body weight. However, Ca deposition was significantly (p<0,05) larger in all problem groups and P deposition in groups fed prebiotic and

synbiotic 1,2 and 10% diets than control group, with no effect on Mg and Fe content. No dose-effect relationship or synergic effect of bifidobacteria and 4'-GOS (synbiotic diets) was observed.

**Table 31.** Bone development of the femur (mg of mineral/g of bone dry weight) in rats

| Diets                 | Dry weight (mg)             | Ash weight (%)             | Calcium content            | Iron content             | Magnesium content        | Phosphorus content           |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|
| <b>AO4</b>            | 453,20±5,59                 | 56,77±0,44                 | 229,59±3,59                | 7,23±0,89                | 3,37±0,12                | 105,85±0,57                  |
| <b>Control</b>        | 349,60±10,76                | 57,24±0,10                 | 156,03±0,42                | 5,71±0,80                | 1,82±0,05                | 103,56±0,00                  |
| <b>Probiotic</b>      | 275,31±4,40 <sup>*/b</sup>  | 54,63±0,70 <sup>*/ab</sup> | 181,58±0,83 <sup>*/b</sup> | 5,06±0,35 <sup>b</sup>   | 1,72±0,08 <sup>a</sup>   | 105,31±0,38 <sup>bc</sup>    |
| <b>Prebiotic 1,2%</b> | 282,25±4,49 <sup>*/b</sup>  | 57,01±0,78 <sup>a</sup>    | 197,67±3,46 <sup>*/a</sup> | 5,79±0,13 <sup>b</sup>   | 1,63±0,00 <sup>*/a</sup> | 108,74±0,00 <sup>*/a</sup>   |
| <b>Prebiotic 5%</b>   | 304,13±2,75 <sup>*/a</sup>  | 55,81±0,41 <sup>ab</sup>   | 182,33±1,18 <sup>*/b</sup> | 5,72±0,44 <sup>b</sup>   | 1,62±0,08 <sup>*/a</sup> | 106,05±0,85 <sup>*/abc</sup> |
| <b>Prebiotic 10%</b>  | 289,00±8,74 <sup>*/ab</sup> | 55,56±0,45 <sup>ab</sup>   | 168,83±3,02 <sup>*/c</sup> | 5,77±0,38 <sup>b</sup>   | 1,60±0,02 <sup>*/a</sup> | 108,17±0,69 <sup>*/ab</sup>  |
| <b>Synbiotic 1,2%</b> | 197,52±7,09 <sup>*/c</sup>  | 53,89±0,64 <sup>*/b</sup>  | 196,74±3,71 <sup>*/a</sup> | 6,25±0,06 <sup>ab</sup>  | 1,73±0,02 <sup>a</sup>   | 107,27±0,41 <sup>*/ab</sup>  |
| <b>Synbiotic 5%</b>   | 267,43±2,74 <sup>*/b</sup>  | 54,51±0,76 <sup>*/ab</sup> | 206,78±0,41 <sup>*/a</sup> | 7,70±0,52 <sup>*/a</sup> | 1,71±0,02 <sup>a</sup>   | 104,20±0,88 <sup>c</sup>     |
| <b>Synbiotic 10%</b>  | 287,10±4,54 <sup>*/ab</sup> | 53,37±0,08 <sup>*/b</sup>  | 181,07±2,75 <sup>*/b</sup> | 6,30±0,21 <sup>ab</sup>  | 1,63±0,01 <sup>*/a</sup> | 108,49±0,42 <sup>*/a</sup>   |

Values are mean±SE, n=6

\* within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-c</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

**Table 32** shows dry weight, ash content and mineral content (Ca, Mg, P and Fe), expressed in mg of mineral/g of dry weight bone, of the tibia in rats after mineral balance. All problem groups showed a significantly (p<0,05) less weighty tibia (from 171,53 mg in synbiotic 1,2% diet to 241,03 mg in prebiotic 1,2% diet) than control group (285,72 mg) as in femur, with the lightest tibia in group fed synbiotic 1,2% diet. No problem group displayed a significantly (p<0,05) greater ash content than control group (58,68%). Ca content of tibia in all problem groups was significantly (p<0,05) higher than control group (144,70 mg) ranging from 171,93 to 188,21 mg, with no statistical differences. No problem group showed a Mg content of tibia with significant differences (p<0,05) respect to control group (2,44 mg). However, P content was significantly (p<0,05) higher in groups fed prebiotic and synbiotic diets than control group (98,60 mg), but differences were observed between groups fed probiotic and control diets. Fe content in tibia was significantly (p<0,05) larger in groups fed prebiotic 5% and synbiotic 1,2 and 10% diets (9,67, 9,50 and 9,81 mg, respectively) than group fed control diet (7,06 mg).

We conclude that tibia neither showed a significant (p<0,05) more weight in problem groups than control group. Although no effect was observed on Mg content of tibia, 4'-GOS supplementation increased Ca and P contents.

**Table 32.** Bone development of the tibia (mg of mineral/g of bone dry weight) in rats

| Diets          | Dry weight (mg)            | Ash weight (%)            | Calcium content             | Iron content              | Magnesium content      | Phosphorus content         |
|----------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|
| AO4            | 382,17±10,87               | 57,43±0,10                | 223,60±5,47                 | 7,68±0,22                 | 2,99±0,22              | 108,33±1,95                |
| Control        | 285,72±5,81                | 58,68±0,10                | 144,70±4,74                 | 7,06±0,99                 | 2,44±0,15              | 98,60±3,55                 |
| Probiotic      | 210,08±7,42 <sup>*/a</sup> | 57,02±0,22 <sup>a</sup>   | 171,93±2,12 <sup>*/b</sup>  | 6,66±0,35 <sup>c</sup>    | 2,58±0,08 <sup>a</sup> | 104,60±0,83 <sup>a</sup>   |
| Prebiotic 1,2% | 241,03±5,92 <sup>*/a</sup> | 57,12±0,04 <sup>a</sup>   | 187,58±2,09 <sup>*/a</sup>  | 7,64±0,71 <sup>bc</sup>   | 2,76±0,07 <sup>a</sup> | 107,69±0,47 <sup>*/a</sup> |
| Prebiotic 5%   | 238,78±5,45 <sup>*/a</sup> | 57,84±0,17 <sup>a</sup>   | 180,64±3,90 <sup>*/ab</sup> | 9,67±0,19 <sup>*/ab</sup> | 2,62±0,13 <sup>a</sup> | 105,92±0,92 <sup>*/a</sup> |
| Prebiotic 10%  | 231,15±6,15 <sup>*/a</sup> | 56,44±0,58 <sup>a</sup>   | 188,21±1,73 <sup>*/a</sup>  | 8,60±0,45 <sup>abc</sup>  | 2,44±0,08 <sup>a</sup> | 106,96±0,86 <sup>*/a</sup> |
| Synbiotic 1,2% | 171,53±3,23 <sup>*/b</sup> | 54,87±1,05 <sup>*/a</sup> | 180,34±0,81 <sup>*/ab</sup> | 9,50±0,10 <sup>*/ab</sup> | 2,71±0,04 <sup>a</sup> | 106,18±0,83 <sup>*/a</sup> |
| Synbiotic 5%   | 221,83±1,42 <sup>*/a</sup> | 54,65±1,18 <sup>*/a</sup> | 185,23±2,42 <sup>*/a</sup>  | 9,22±0,49 <sup>ab</sup>   | 2,65±0,18 <sup>a</sup> | 107,33±1,00 <sup>*/a</sup> |
| Synbiotic 10%  | 234,43±3,13 <sup>*/a</sup> | 55,49±1,89 <sup>a</sup>   | 179,92±0,28 <sup>*/ab</sup> | 9,81±0,39 <sup>*/a</sup>  | 2,75±0,24 <sup>a</sup> | 105,76±0,69 <sup>*/a</sup> |

Values are mean±SE, n=6

\* within the same column shows significant differences (p<0,05) by bilateral separate means test in groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets with respect to control group

<sup>a-c</sup> Means with unlike superscript letter in the same column are significantly different by Tukey's test (p<0,05) among groups fed probiotic, prebiotic and synbiotic diets

Chonan *et al.* (1995) observed that in rats fed diet containing 4'-GOS 5% Ca content of femur increased significantly (p<0,05), but no effect was reported in dry and ash weights respect to control group. On the contrary, ash weight of tibia increased significantly but dry weight and Ca content were not affected. In our study no significant (p<0,05) increase was observed in dry and ash weights of femur and tibia, but in both bones Ca content was significantly (p<0,05) higher in all problem groups than control group. Moreover, Ca content of the diet has effect on bone mineralization. Thus, a diet containing 2.150 mg Ca/100 g increased significantly ash weight of femur and Ca content of femur and tibia, however a diet containing 215 mg Ca/100 g did not affect parameters of bone mineralization (Chonan and Watanuki, 1996). Diets used in the present work contained an intermediate Ca content (572 mg de Ca/100 g) to that used by Chonan and Watanuki although we used the same amount of Ca in all diets, therefore the differences showed in Ca deposition was due to the bifidobacteria or 4'-GOS supplementation.

## 7. Relationship among morphology variables and pH of the large intestine content, mineral bioavailability and bone mineralization

### 7.1. Effect of initial body weight on the weight of target organs (cecum, colon, femur and tibia)

A second study to check the effect of diets on wall cecum weight, wall colon weight, femur dry weight and tibia dry weight was carried out, but controlling the influence of initial body weight (co-variable). Thus, we can remove the effect of the different initial weights found in the groups on the assessment of the effect of diets on the target organ weights (cecum, colon, femur and tibia). In Table 33 can be observed as the diet was a factor of variation of the target organ's weights and in three of them (cecum weight, wall colon weight and tibia dry weight) the initial body weight was not determinant on the significant differences due to the

type of feeding. Only in femur dry weight we cannot state that groups with different femur weights will not be due to the different initial body weight at the beginning of the study.

**Table 33.** Study of the effect of initial body weight on the weight variation of target organs

| Variable          | Diet | Co-variable: Initial body weight |
|-------------------|------|----------------------------------|
| Wall cecum weight | ***  | NS                               |
| Wall colon weight | ***  | NS                               |
| Femur dry weight  | ***  | **                               |
| Tibia dry weight  | ***  | NS                               |

Statistical significance: \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; NS=not significance

## 7.2. Correlation study among morphology parameters, pH of the large intestine content, mineral bioavailability and bone mineralization

**Table 34** shows the coefficients of correlation between pH values of the cecal and colonic contents and the histological parameters of their mucosa. Thus, pH of cecal content was not correlated with crypt depth or cell density of the cecum, while , pH of colonic content was negatively correlated with crypt depth and cell density of proximal colon ( $r=-0,773$  and  $-0,489$ , respectively) and with cell density of distal colon ( $r=-0,644$ ). Therefore, it is in the colonic mucosa where cell proliferation is observed due to the lowest value of pH among all the colonic contents, generated by the fermentation of dietary 4'-GOS. However, other authors have found in the cecum a negative correlation between pH and crypt depth (Tashiro *et al.*, 1997), being the pH less correlated with cell proliferation in the more distal portions of the large intestine (Edwards *et al.*, 1992), since the other sources of NDO used by these authors were mainly fermented in the cecum. Nevertheless, in our work the fermentation of the dietary NDO by cecal or colonic microflora or that provided in the diet (synbiotic diets), occurred so much in the cecum as much as in the colon, as show the low pH values of their contents (Tables 27 and 28) and the high correlation found between the variables pH of the cecal and colonic contents ( $r=0,87$ ).

**Table 34.** Coefficients of correlation between pH of cecal and colonic contents with the other histological parameters in the cecal and colonic mucosa

|          |                 | Crypt depth of cecum          | Cell density of cecum          | pH colon                    |                              |
|----------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| pH cecum | CC <sup>o</sup> | NS                            | NS                             | 0,870                       |                              |
|          | Significance    |                               |                                | 0,000                       |                              |
|          |                 | Crypt depth of proximal colon | Cell density of proximal colon | Crypt depth of distal colon | Cell density of distal colon |
| pH colon | CC              | -0,773                        | NS                             | -0,489                      | -0,644                       |
|          | Significance    | 0,000                         |                                | 0,015                       | 0,001                        |

NS=not significant for  $p<0,05$ , <sup>o</sup> CC: correlation coefficient

In **Table 35** are shown the coefficients of correlation between mineral AA and the parameters measured in the cecum and colon. AA of Ca was negatively correlated with the pH

of colonic content ( $r=-0,502$ ) and positively with the crypt depth and cell density of proximal colon ( $r=0,418$  and  $0,556$ , respectively) and distal colon ( $r=0,870$  and  $0,581$ , respectively). AA of Mg was negatively correlated with the pH of the cecal and colonic contents ( $r=-0,785$  and  $r=-0,728$ , respectively), but positively with crypt depth of the proximal and distal colon ( $r=0,639$  and  $r=0,590$ , respectively) and with cell density of distal colon ( $r=0,658$ ). AA of P was positively correlated with cell density of cecum ( $r=0,601$ ), crypt depth of distal colon ( $r=0,581$ ) and cell density of proximal colon ( $r=0,423$ ). AA of Fe was negatively correlated with the pH of the cecal content and crypt depth of cecum ( $r=-0,671$  and  $-0,554$ , respectively). The absorption of this mineral was also negatively correlated with the pH of colonic content and positively with the crypt depth of the proximal colon ( $r=-0,666$  and  $r=0,730$ , respectively).

**Table 35.** Coefficients of correlation between mineral apparent absorption and the parameters measured in the large intestine

|                                |                 | Calcium | Magnesium | Phosphorous | Iron   |
|--------------------------------|-----------------|---------|-----------|-------------|--------|
| pH cecum                       | CC <sup>¶</sup> | NS      | -0,785    | NS          | -0,671 |
|                                | Significance    |         | 0,000     |             | 0,000  |
| pH colon                       | CC              | -0,502  | -0,728    | NS          | -0,666 |
|                                | Significance    | 0,012   | 0,000     |             | 0,000  |
| Crypt depth of cecum           | CC              | NS      | NS        | NS          | -0,554 |
|                                | Significance    |         |           |             | 0,005  |
| Crypt depth of proximal colon  | CC              | 0,418   | 0,639     | NS          | 0,730  |
|                                | Significance    | 0,042   | 0,001     |             | 0,000  |
| Crypt depth of distal colon    | CC              | 0,870   | 0,590     | 0,581       | NS     |
|                                | Significance    | 0,000   | 0,002     | 0,003       |        |
| Cell density of cecum          | CC              | NS      | NS        | 0,601       | NS     |
|                                | Significance    |         |           | 0,002       |        |
| Cell density of proximal colon | CC              | 0,556   | NS        | 0,423       | NS     |
|                                | Significance    | 0,005   |           | 0,040       |        |
| Cell density of distal colon   | CC              | 0,581   | 0,658     | -0,503      | NS     |
|                                | Significance    | 0,003   | 0,000     | 0,012       |        |

NS=not significant for  $p<0,05$ , <sup>¶</sup> CC: correlation coefficient

### 7.3. Regression study among mineral absorption, morphological parameters and the pH of the large intestinal content

The lineal regression study carried out by successive steps technique, allowed to obtain lineal regression equations for Ca, Mg and Fe absorption to predict their absorption percentages in the large intestine from the variables studied (pH, crypt depth and cell density of the cecum and colon). For P it was not possible to obtain a lineal regression model to forecast the behaviour of the intestinal absorption.

For Ca was found a lineal relationship between Ca absorption and crypt depth in distal colon: % Ca absorption =  $-43,86 + 0,32 \times$  crypt depth of distal colon,  $R^2=0,76$ ). This relationship increase lineally, thus the groups with a higher crypt depth in the distal colon, showed the larger Ca absorption percentages (groups fed prebiotics diets and synbiotic 5 and 10% diets).

For Mg were found the following four multiple lineal regression models:

(1) % Mg absorption =  $28,10 + 0,06 \times \text{crypt depth of proximal colon} + 1,14 \times \text{cell density of distal colon}$ ,  $R^2=0,67$ ).

(2) % Mg absorption =  $166,54 + 0,38 \times \text{cell density of distal colon} - 17,23 \times \text{pH of cecal content}$ ,  $R^2=0,63$ ).

(3) % Mg absorption =  $203,94 - 5,94 \times \text{pH of colonic content} - 16,23 \times \text{pH cecal content}$ ,  $R^2=0,63$ ).

(4) % Mg absorption =  $88,67 + 0,74 \times \text{cell density of distal colon} + 0,045 \times \text{crypt depth of proximal colon} - 7,91 \times \text{pH of cecal content}$ ,  $R^2=0,70$ ).

The previous regression models show that Ca absorption mainly takes place in the colon, due to groups with a higher crypt depth and similar cell density show bigger cells, and therefore a larger surface for mineral absorption. Thus, Delzenne *et al.* (1995) proposed the increase on the surface for absorption in the large intestine as a mechanism for explaining a higher retention of Ca and Mg. Equally, it has been described in isolated rat (Diener *et al.*, 1993) and human (Rowe *et al.*, 1993) colonocytes that their exposition to SCFA produced a decrease of intracellular pH. For recovering the intracellular pH, cells have some mechanisms involving  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and  $\text{H}^+/\text{AGCC}$  co-transport. This ion exchange cause cell swelling and increase intracellular  $\text{Na}^+$  content.

On the other hand, Mg absorption not only takes place in the colon but also in the cecum, as showed by the lineal regression. Low pH values of the cecal content lead the formation of soluble forms of this mineral, stimulating so its passage through the cecal mucosa (Scharrer and Lutz, 1992; Baba *et al.*, 1996). However, pH of the colonic content had a small effect or it was overlapped by morphological variables in this portion of the intestine, since its incorporation to the regression equation do not increased the coefficient of correlation (0,70), in spite of showing a significant ( $p<0,001$ ) effect. Regarding to the effect of the cecal crypts, it is important to emphasize that Mg absorption was increased with a higher cell density in the distal colon and crypt depth in the proximal colon. This fact may be due to the competition described between Ca and Mg for the absorption sites in the large intestine (Ohta *et al.*, 1994a). Some studies have shown that cecum and colon have the capacity to absorb Ca and Mg, however the portion of intestine where this function takes place changes according to the mineral and the source of fermentable fiber which stimulates the mineral absorption (Demigné *et al.*, 1989; Levrat *et al.*, 1991; Younes *et al.*, 1993; Ohta *et al.*, 1995a). Chonan and Takahashi (1999) have reported that the effect of GOS on Ca absorption mainly takes place in the cecum due to its trophic effect on cecal mucosa, while Mg absorption is due to the contribution of the different parts of the intestine (cecum, colon and rectum). However, Delzenne *et al.* (1995) using FOS as source of non-digestible carbohydrates, found that Mg absorption mainly takes place in the colon, and Ca absorption in the cecum. In our study no positive relationship between Ca absorption and the morphological variables in the cecum was found. On the contrary, in proximal and distal colon differences in the crypt depth and cell density among

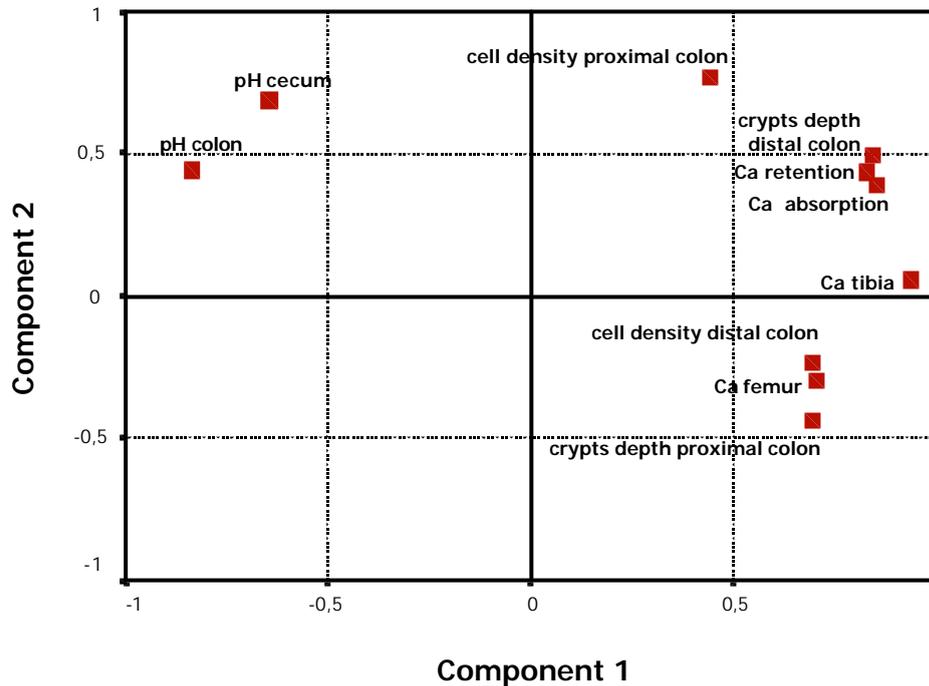
groups were described, and might explain the Ca and Mg absorption due to the increase of the absorption surface. Moreover, the pH decrease of the cecal content due to the microbial fermentation of GOS can generate soluble forms of Mg more easily absorbable.

Finally, for Fe as well as for Mg, it was found a multiple lineal relationship between Fe absorption, crypt depth in proximal colon and pH of colonic content: % Fe absorption =  $-47,43 + 0,09 \times \text{crypt depth of proximal colon} - 10,42 \times \text{pH colonic content}$ ,  $R^2=0,56$ ). The effect of fermentable carbohydrates on Fe bioavailability is little documented. Kim and Atallah (1993) have proposed an absorption mechanism through Fe soluble complexes with free carboxyl groups derived from the fermentation when pectin is used as the source of fermentable carbohydrates. These carboxyl groups were available for ionic interaction with Fe soluble complexes, facilitating in this way their passage through cell membrane.

#### 7.4. Factorial analysis

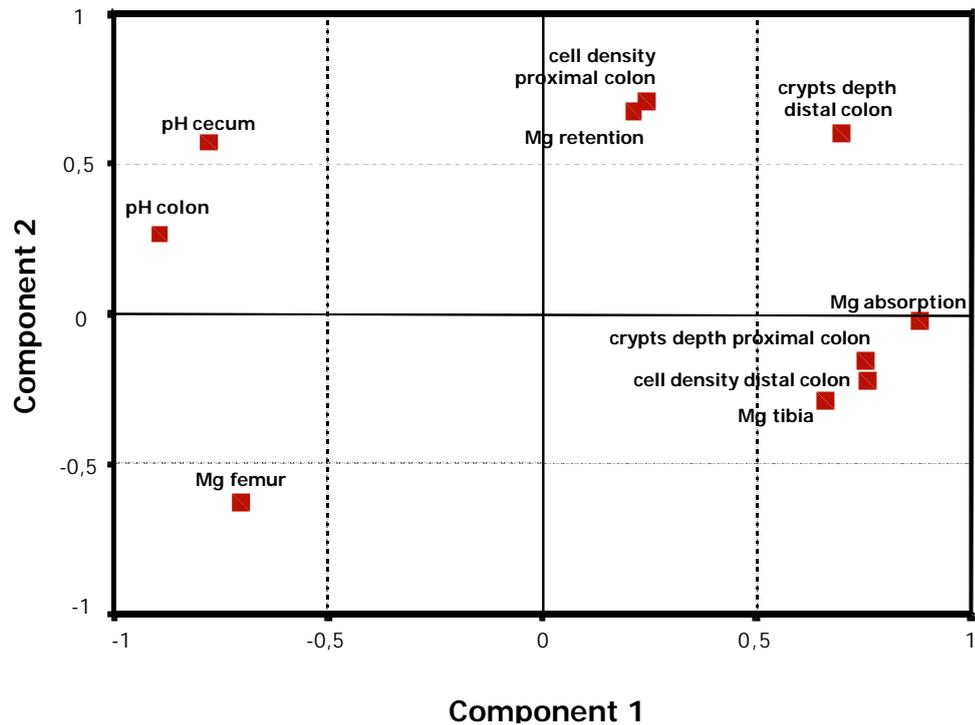
As a factorial extraction method we used the principal components anal (PCA) to obtain lineal combinations among the variables and formulate hypothesis related with the causal mechanisms. This study was separately done with the four minerals (Figures 12-15), to identify the relationships between the mineral content in femur and tibia and the morphological variables of large intestine and the pH of the cecal and colonic content. Crypt depth and cell density of the cecum were removed from the study because did not show variations among the groups.

**Figure 12** shows the PCA of Ca with a total explained variance of 79,75%. Component 1 (vertical axis) displays the inverse relationship among pH values of cecal and colonic contents and the remaining variables. As it is shown in Table 35 this relationship is higher ( $r=-0,50$ ) between pH of the colonic content and the Ca absorption. In the Component 2 (horizontal axis) has been evaluated the association between the variables by proximity in the graph. In the four figures pH of the cecal and colonic contents are close in the graph, showing that low values in one portion of the large intestine also appears in the other portion ( $r=0,87$  in Table 34). Component 2 also shows the lineal relationship between Ca AA and retention with crypt depth of the distal colon (Figure 12) and between intestinal absorption of Ca and Ca content in tibia.



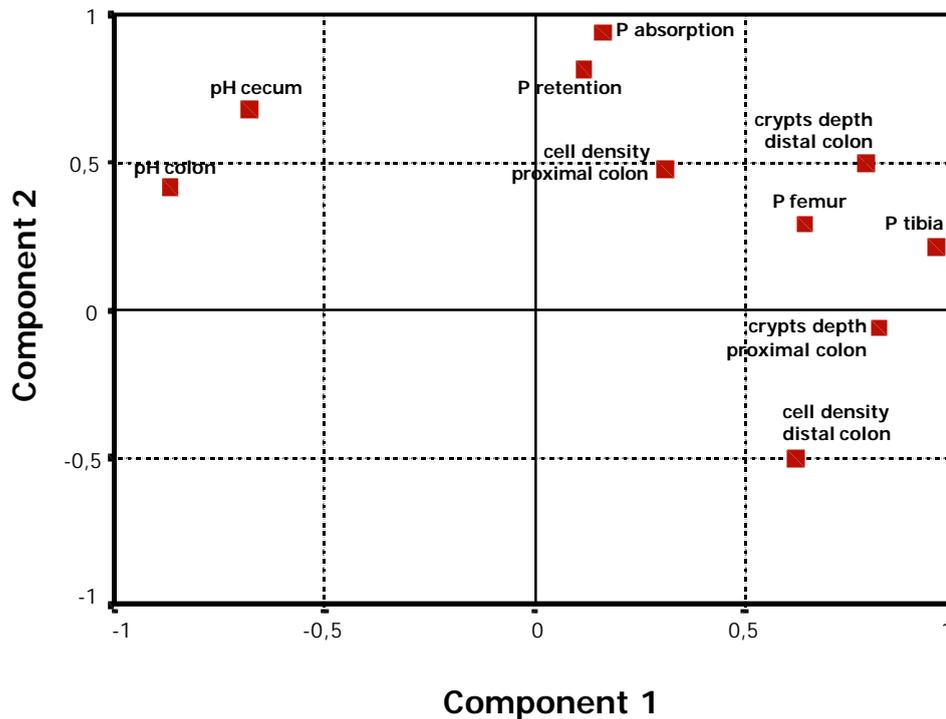
**Figure 12.** Graphic representation of principal components analysis of Ca

The PCA carried out to show graphically the relationship among Mg content in the femur and tibia and the parameters measured in the large intestine (**Figure 13**) displayed a total explained variance of 71,17%. As in the previous mineral, Component 1 showed a inverse relationship between pH of the cecal and colonic contents and Mg absorption. Moreover, from the Figure 13 three points can be reported: a) the existence of a great relative distance between Mg absorption and retention variables, due to a large urinary excretion of Mg, mainly in groups fed synbiotic 1,2 and 5% diets (Table 24); b) the relationship of the Mg content in tibia with crypt depth of the proximal colon and cell density in distal colon (as it was described with Ca); and c) the absence of relationship of Mg content in femur with all the studied variables. Finally, we can observe the four lineal regression models established for this mineral by means of the dispersion of the variables in the graph.



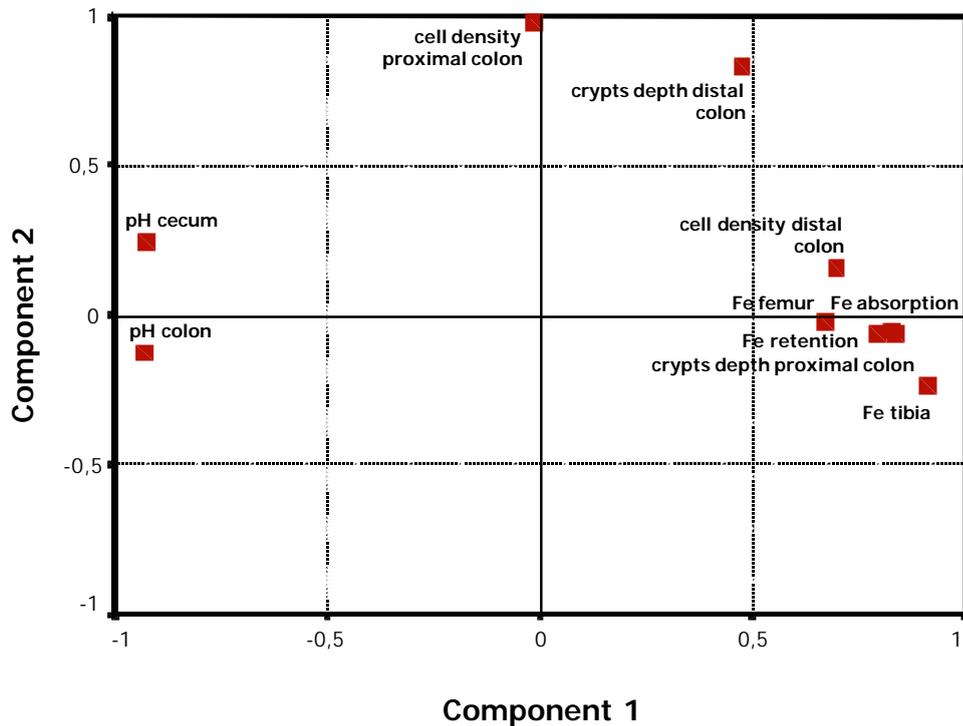
**Figure 13.** Graphic representation of principal components analysis of Mg

**Figure 14** shows the PCA to observe graphically the relationship among P balance, its content in femur and tibia and the parameters measured in cecum and colon, showing a total explained variance of 74,01%. On the opposite to the two previous studies, the distribution of the variables in the graph showed a higher dispersion. Nevertheless, it can be appreciated again a relationship of proximity between both pH parameters, and between P absorption and retention (which displays a negligible P urinary excretion). P content in femur and tibia showed a positive relationship with high values in crypt depth of proximal and distal colon, but inversely proportional to the low pH values, more clearly with P content in tibia. These relationships can be appreciated in the graph due to their disposition in the plane.



**Figure 14.** Graphic representation of principal components analysis of P

The last PCA (**Figure 15**) was carried out to study the degree of association among the variables Fe content in femur and tibia, Fe absorption and retention, pH of cecal and colonic contents and the morphological parameters of both portions in the large bowel. Total explained variance was of 75,30%, also with Fe is again observed the association by proximity of both pH of cecal and colonic contents and an inverse relationship between the decrease of these two variables with the increase of Fe absorption and retention. The multiple regression model brought up to interpret Fe absorption from the pH values of the cecal content and crypt depth of the of the proximal colon, can be assessed in the present figure. Finally, Fe content in femur and tibia showed a high relationship of proximity with the values obtained for Fe absorption and retention. Therefore, we can assume that an increase in the intestinal captivation of Fe might be corresponded with a higher Fe content in femur and tibia. Equally but not in a direct way, Fe content in femur and tibia is positively associated with the high values of cell density of the distal colon and crypt depth of the proximal colon, and inversely with the low pH values of the cecal and colonic contents.



**Figure 15.** Graphic representation of principal components analysis of Fe

The mechanisms that involve the mineral absorption in the large intestine mediated by the presence of NDO in the diet could be included in two. The first due to the formation of soluble complexes as a consequence of pH decrease, and a second mechanism related to the increase of the surface to mineral absorption, as a reflection of the trophic effect of NDO on cecum and colon mucosa. In the present study, the relationship between acidification of intestinal lumen and the increase of mineral absorption has been clearly showed for Mg and Fe. For both minerals groups fed prebiotic 1,2 and 10% (4 and 6) and synbiotic (7, 8 and 9) diets displayed higher values in their absorption than the other diets. Mg and Fe also obtained high correlation factors between apparent absorption and pH of cecal and colonic contents, and in the regression equations pH was shown as a predictive variable of its intestinal absorption. Likewise, for Ca it was obtained a significant correlation factor between pH of colonic content and mineral absorption. However the highest correlation factor was observed with crypt depth of distal colon. It was the only of the studied variables which displayed a lineal relationship increasing, and groups fed prebiotic (4, 5 and 6) and synbiotic 5 and 10% (8 and 9) diets showed higher values of absorption and crypt depth. Moreover, Mg and Fe absorption were correlated linearly with other parameters of colonic mucosa, such as crypt depth in the proximal portion (Mg and Fe) and cell density in distal colon (Mg). The fact that some minerals interact between them, showing a competition for absorption places, could be not reflected in the results obtained in this study.

It is known that Fe shows a competition with Ca and Mn for the intestinal absorption (Lönnerdal, 1989; Hallber and Rossander-Hulthen, 1993), and increasing dietary Ca and P inhibit Mg absorption from the intestine (Ohta *et al.*, 1994a). However for the three minerals (Ca, Mg and Fe), it has been shown that dietary 4'-GOS supplementation enhanced apparent absorption in groups fed prebiotic and synbiotic diets if compared with the group fed control diet. Taking into account that has been described intestinal absorption competition among the minerals (Ca and Fe and Ca and Mg), the places for their absorption have been different, such as proximal colon for Mg and Fe and distal colon for Ca.

No clear relationships were found between apparent absorption of P and the two factors involved on its absorption and derived from the intestinal fermentation of 4'-GOS (pH and increase of absorption surface), as correlation and regression studies have shown. Nevertheless, an increase of P absorption in some groups (fed probiotics and prebiotics 1,2 and 10% diets) has been described with respect to the control group. This suggests that other factors not evaluated could enhance P absorption. Thus Brommage *et al.* (1993) described an increase of Ca, Mg and Zn absorption related with the presence of dietary lactulose. It would be presumable to think that during thermal process of infant formula some amount of this compound could be produced (Sarriá *et al.*, 2001), with demonstrated prebiotic effect (Sahota *et al.*, 1982; Kawaguchi *et al.*, 1993) which could stimulate P absorption.

Finally, the four figures of principal components analysis display graphically the two mechanisms through 4'-GOS improve mineral absorption. *Component 1* shows the effect of pH decrease in the soluble complexes of Ca, Mg and Fe formation and easily absorbable by intestinal mucosa. *Component 2* summarised the different effects that colonic mucosa (increase of crypt depth and cell density) has on mineral absorption and its deposition on bones (more evident on tibia), that is due in the last instance to 4'-GOS fermentation.

## **CONCLUSIONS**

### **Conclusions to the first objective:**

- 1.1. The *in vitro* fermentation of four types of non-digestible oligosaccharides available by the species of bifidobacteria *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* and *B. longum*, shows the galactooligosaccharide 4'-galactosyllactose as the most suitable for bifidobacteria growth.
- 1.2. The species of infant bifidobacteria that show a larger growth after seven days of incubation in the presence of 4'-galactosyllactose are *B. breve* and *B. bifidum*.

### **Conclusion to the second objective:**

2. The bifidobacteria (*B. bifidum* and *B. longum*) added to the studied probiotic infant show a viability above the minimum recommended level ( $10^6$  cfu/g) during the period of consumption, estimated in 14 days.

### **Conclusion to the third objective:**

3. The administration of the probiotic infant formula (*B. bifidum* and *B. longum*) from the fourth month to the first year of life, increase significantly fecal bifidobacteria counts, at seven and nine months of age with regard to those fed control infant formula.

### **Conclusions to the fourth objective:**

- 4.1. All problem diets stimulate to a great or minor extent mineral absorption, diets formed by prebiotic 10% and synbiotic 5 and 10% infant formulas increase more clearly Ca, Mg and Fe absorption than control group. The absorption of phosphorous is larger in the group fed prebiotic 10% infant formula.
- 4.2. The supplementation with increasing concentrations of 4'-GOS (1,2, 5 and 10%) to the diets do not raise proportionally the mineral absorption.

### **Conclusion to the fifth objective:**

5. The addition of probiotics (*B. bifidum* and *B. longum*) and prebiotics (4'-galactosyllactose) in infant formulas to rats, modify the epithelium of the colon both in the proximal and distal portions. This modification lead to an increase in the crypts depth and the number of cells per crypt (cell density). The use of galactooligosaccharides at different concentrations is not related to a modification in the epithelium of the colon. It is

observed no modification in the epithelium of the cecum due to the probiotics and prebiotics addition to the infant formulas.

**Conclusions to the sixth objective:**

- 6.1. The decrease of pH in the content of the cecum and colon due to the fermentation of 4'-galactosyllactose present in the diet, is clearly related to a higher Ca, Mg and Fe absorption.
- 6.2. The increase of the mineral absorption shows a high correlation factor to the histology parameters measured in the mucosa of the large intestine. The absorption of Ca takes place in the distal colon, the absorption of Fe in the proximal colon, and the absorption of Mg in the proximal and distal colon.
- 6.3. The use of probiotics and prebiotics in infant formulas, increases the content of Ca, P and Fe in the femur and tibia with respect to the group fed with control diet.

**Conclusion to the seventh objective:**

7. The deposit of Ca, P and Fe in the femur and tibia is related to the increase of crypts depth and the number of epithelial cells in the colon, and to the decrease of pH of the cecal and colonic contents. With regard to the increase of Mg deposition, it is only affected in the tibia and is related with crypts depth and the increase in the number of epithelial cells in the colon.