

VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD MODULADORA DE LA FLORA INTESTINAL DEL SIMBIÓTICO NORMODIGEST "IN VITRO"

Viadel, Blanca¹, Porta, Sonia¹ y Monsell, Antonio²

¹AINIA, Centro Tecnológico | C/ Benjamín Franklin, 5-11 Paterna (Valencia)

²DERBÓS, Laboratorio Natural | Avda. Les Mases - P.I. Les Mases Rótova (Valencia)

ABSTRACT

In this study, the authors used a new method with a dynamic digester in order to check whether the probiotics contained in the commercial product Normodigest in biphasic vials resist the gastric digestion and whether they have a positive influence in the gut microbiota. The methodology of the test and the analytical results are discussed. The conclusion is that Normodigest has a positive influence in the intestinal flora.

1. Introducción

Tras evidenciarse la importancia de la flora intestinal en numerosos procesos fisiológicos, bien de forma directa o indirecta, siempre se han planteado métodos que permitan valorar la efectividad de un **complemento alimenticio** con características pre-, pro- o simbióticas. Esta efectividad viene inicialmente determinada por la capacidad de colonización efectiva que tienen las bacterias componentes de la microbiota que se administran en los **complementos alimenticios**. Sin esa colonización todos los procesos fisiológicos en los que participan o contribuyen los microorganismos no son viables, por lo que si no se garantiza su capacidad colonizadora, no se evidenciará su actividad en el organismo huésped simplemente por falta de sustrato en el mismo.

El **Departamento de Investigación, Desarrollo e innovación de Derbós, Laboratorio Natural**, junto al **Centro Tecnológico AINIA**, han evaluado la capacidad de colonización de un preparado simbiótico comercial, en concreto **NORMODIGEST**, y han evidenciado la capacidad de colonización del mismo por parte de los probióticos mediante la utilización del **Digestor "in vitro" de Fermentación Colónica** disponible en AINIA. Dicha capacidad de colonización es condición indispensable para atribuir posteriormente cualquier actividad fisiológica al producto.

En primer lugar se ha determinado la capacidad de los probióticos para superar la barrera ácida de los jugos gástricos y se ha cuantificado la resistencia de la cubierta entérica a una digestión gastro-intestinal completa de 8 horas.

Finalmente, se ha evaluado su capacidad de colonización del intestino grueso.

En este artículo se resume la metodología y los resultados obtenidos aplicados al producto **NORMODIGEST** mediante la utilización de los digestores dinámicos diseñados por el Centro Tecnológico AINIA.

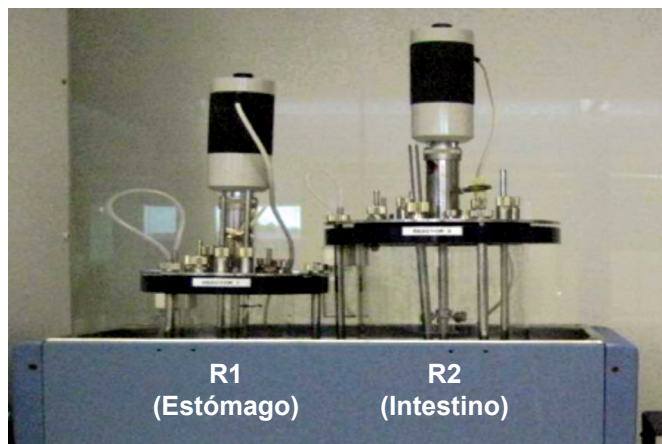
2. Determinación de la Resistencia Gástrica y Gastrointestinal de las bacterias probióticas y Diseño de los Ensayos

Teniendo en cuenta que los microorganismos objeto de estudio tienen que ser capaces de colonizar el intestino grueso, inicialmente ha sido necesario garantizar que sean capaces de superar el medio ácido del estómago y llegar viables al intestino. En este sentido se han realizado los ensayos de digestión gástrica con el probiótico en estudio ya que una de las principales variables a controlar para evaluar la viabilidad de los probióticos es el **pH ácido del estómago**. Posteriormente se han llevado a cabo los ensayos de digestión gástrica e intestinal para evaluar la **resistencia gastrointestinal** de las bifidobacterias microencapsuladas presentes en el producto **NORMODIGEST** frente a las condiciones de acidez del estómago y de las sales biliares del intestino. Finalmente, con el fin de verificar la relación de la concentración con la viabilidad del probiótico tras su paso por el tracto gastrointestinal se han llevado a cabo los ensayos de resistencia gastrointestinal partiendo de mayor concentración de probiótico que en los anteriores ensayos.

a. Metodología

Para la realización de dichos ensayos se ha utilizado el **Digestor "in vitro" de Fermentación Colónica**, concretamente los reactores que simulan el estómago (R1) y el intestino (R2) (Figura 1).

Figura 1: Reactores estómago (R1) e intestino (R2).



Con el fin de reproducir la resistencia del probiótico a su paso por el tracto gastrointestinal hasta su llegada al intestino delgado se ha llevado a cabo la simulación de la digestión durante 8h: Digestión gástrica durante 2h (*tratamiento enzimático con pepsina, a pH ácido*) y digestión intestinal durante 6h (*tratamiento enzimático con pancreatina y extracto biliar, a pH neutro*).

Durante todo el proceso de digestión gastrointestinal, se ha llevado a cabo la toma de muestras para evaluar la viabilidad del simbiótico mediante el análisis de Bifidobacterias con el recuento microbiano en placa.

b. Resultados

El recuento microbiológico obtenido del probiótico en función del pH del estómago ha sido el mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1: Recuento microbiológico en función del pH a diferentes pH's.

Muestra	Ufc/ml	pH
Muestra de Referencia	1.7×10^6	5
Digerido Gástrico	2.6×10^5	3.5
Digerido Gástrico	1.8×10^5	2

Tras el proceso de digestión gástrica, las bifidobacterias tienen una alta viabilidad y no hay apenas diferencias significativas entre la digestión a **pH 3.5** y a **pH 2**, demostrando que la cápsula entérica de la **Bifidobacteria** le ofrece una resistencia frente al pH ácido del estómago.

Tras la evidencia del paso efectivo por el estómago se llevan a cabo los ensayos de **digestión gastrointestinal** por triplicado observándose que con la incorporación de 1 vial (*con niveles de 1.4×10^6 ufc/ml de Bifidobacterias*), se logran detectar niveles de 10^2 ufc/ml en el digerido intestinal. Ello significa que la digestión gástrica afecta levemente a la viabilidad del microorganismo, pero la digestión intestinal provoca un descenso en la concentración del probiótico hasta niveles, en algunos casos, no detectables con la técnica analítica.

En este sentido, se ha llevado a cabo otro ensayo de **resistencia gastrointestinal** partiendo de mayor concentración de probiótico con el fin de conseguir mayor número de Bifidobacterias viables tras el paso por el tracto gastrointestinal. En este caso la muestra de referencia de **NORMODIGEST** contiene 1.8×10^8 ufc/ml. La toma de muestra se lleva a cabo tras la digestión gástrica (*2 horas*) y tras la digestión intestinal (*8 horas*).

Los resultados obtenidos tras la realización del ensayo de resistencia gastrointestinal con mayor concentración de probiótico de partida se indica en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados tras mayor concentración de probiótico de partida.

Muestra	Ufc/ml
Muestra de Referencia	1.8×10^8
Digerido Gástrico	$< 1.0 \times 10^3$
Digerido Intestinal	< 10

Tal y como se observa en la tabla, la incorporación de mayor cantidad de probióticos en la muestra de referencia no da lugar a una mayor viabilidad del probiótico tras la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, para llevar a cabo los ensayos de fermentación colónica se ha utilizado la cantidad de probiótico recomendada por la empresa (1 vial/día).

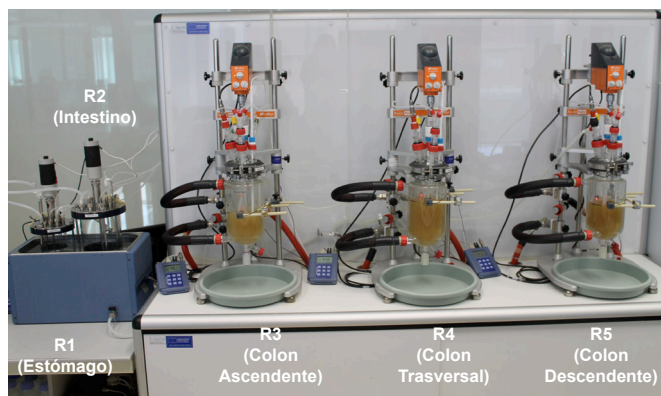
3. Determinación de la capacidad de colonización "in vitro" de la flora intestinal

a. Metodología

El principal grupo microbiano a testar son las **Bifidobacterias**. Para ello se ha partido de muestras de **NORMODIGEST** (*simbiótico*) monitorizando la viabilidad de las Bifidobacterias tras el proceso de digestión gastrointestinal y durante el periodo de estabilización y fermentación colónica.

Para la realización de dichos ensayos se ha utilizado el **Digestor "in vitro" de Fermentación Colónica** diseñado y desarrollado por el **Centro Tecnológico AINIA**. El equipo destinado a la simulación del proceso de digestión del intestino grueso está constituido por cinco reactores: estómago (*R1*), intestino delgado (*R2*), colon ascendente (*R3*), transversal (*R4*) y descendente (*R5*), conteniendo los últimos 3 reactores una alta densidad de microflora activa de origen humano (*Figura 2*).

Figura 2: Equipo de simulación del proceso digestivo.



La descripción del funcionamiento del **Digestor "in vitro" de Fermentación Colónica** es la siguiente: Los tres reactores del colon se inoculan con una solución fecal al 20% de voluntarios adultos sanos, población microbiana que se asemeja a la que se encuentra en el tracto gastrointestinal humano. Las bacterias presentes en cada fase del colon tienen un pH óptimo de actuación siendo el pH en el colon ascendente de 5,5 - 6; en el colon transversal de 6 - 6,4 y en el colon descendente de 6,4 - 6,8. Con el fin de regular los cambios de pH que se producen durante la digestión y mantenerlos en los intervalos óptimos para cada fase, se incorpora ácido o base a cada uno de los reactores. El volumen de los reactores es determinado por el **tiempo de residencia "in vivo"**, en la correspondiente región del tracto gastrointestinal. Los flujos entre el estómago e intestino funcionan de forma semicontinua, mientras que el funcionamiento del sistema del colon ascendente, transversal y descendente se lleva a cabo de modo continuo, simulando las condiciones

reales del tracto digestivo.

La **temperatura** es constante en todo momento durante el proceso de digestión, ya que se mantiene y controla a 37°C en todas las etapas del proceso, ya que temperaturas diferentes pueden afectar al crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Todos los reactores se mantienen en condiciones anaeróbicas durante todo el proceso de fermentación.

En los ensayos de fermentación colónica llevados a cabo, el proceso fermentativo tiene una duración de 26 días. Durante el periodo basal (*12 días*), se lleva a cabo la estabilización de la microbiota fecal humana en el colon ascendente, transversal y descendente. La microbiota se adapta a las condiciones "in vitro" impuestas hasta alcanzar niveles similares a los presentes en cada región específica del colon. Durante el periodo basal se adiciona medio de cultivo al estómago tres veces al día (*con el fin de simular las tres comidas principales del día*).

Durante el periodo de tratamiento (*14 días*), con el fin de simular la toma diaria de 1 vial de simbiótico, en la primera toma del día se incorpora en el medio de cultivo 1 vial de simbiótico, con los microorganismos objeto de estudio con el fin de evaluar la colonización y efecto del probiótico en la microbiota fecal, siendo las dos siguientes adiciones de medio de cultivo sin probiótico.

Debido a que el producto testado se consume en ayunas, para llevar a cabo las incorporaciones del simbiótico durante el periodo de tratamiento, se ha modificado ligeramente el proceso de **digestión gastrointestinal** descrito en los ensayos de **resistencia gastrointestinal**, en base a las siguientes consideraciones:

- 1) Tras la ingesta de la dosis recomendada de simbiótico **no se produce el proceso de masticación** (*obviándose dicha fase durante los ensayos*).
- 2) La **digestión gastrointestinal** es más rápida, considerándose por tanto la duración de la digestión gástrica de 60 minutos (*en vez de 120 minutos, tal y como se indicó en los ensayos de resistencia gastrointestinal*).
- 3) No se lleva a cabo la fase de **digestión intestinal** ya que al pasar el simbiótico directamente al colon no se produce la liberación de enzimas intestinales en el intestino delgado.

Periódicamente durante todo el proceso de **digestión gástrica y de fermentación colónica** se han tomado alícuotas en cada uno de los tres reactores del colon a intervalos regulares y se ha llevado a cabo la caracterización de los grupos microbianos de la flora bacteriana presente en las distintas regiones del colon (*Género Lactobacillus*, *Género Bifidobacterium*, *Familia Enterobacteriácea*, *Anaerobios totales*, *Género Clostridium*) con técnicas clásicas de recuento bacteriano.

b. Resultados

En el periodo de tratamiento se ha incorporado 1 vial de **NORMODIGEST** una vez al día en el estómago (*R1*). Con el fin de verificar la cantidad de probiótico que llega viable al colon, se ha llevado a cabo la toma de muestras antes y después de la digestión gástrica (*60 minutos*). Tras el proceso de digestión gástrica se observa que las Bifidobacterias tienen una alta viabilidad (1.4×10^6 ufc/ml muestra de referencia vs. 2.1×10^5 ufc/ml tras la digestión gástrica), demostrando que el menor tiempo de exposición de la bifidobacteria al pH ácido de la digestión gástrica (*60 minutos vs. 120 minutos*) y la no exposición a la digestión intestinal, no afecta a la viabilidad de dicha cepa.

Los resultados obtenidos durante los ensayos de fermentación colónica correspondientes a la evolución de la microbiota en los tres reactores del colon, se muestran en las siguientes tablas de las Figuras 3, 4 y 5.

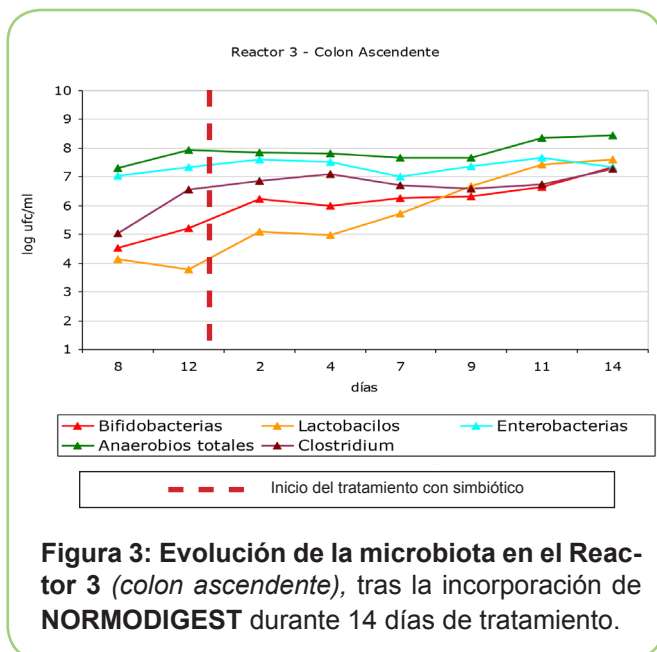


Figura 3: Evolución de la microbiota en el Reactor 3 (colon ascendente), tras la incorporación de NORMODIGEST durante 14 días de tratamiento.

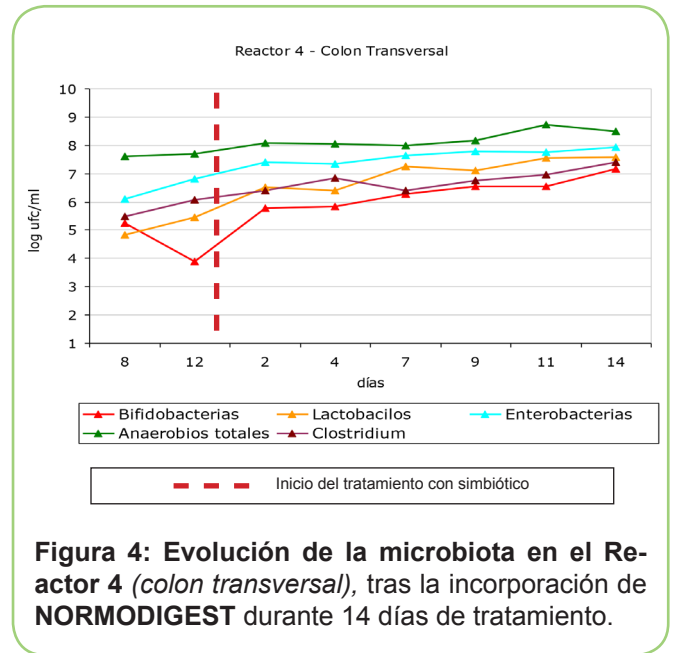


Figura 4: Evolución de la microbiota en el Reactor 4 (colon transversal), tras la incorporación de NORMODIGEST durante 14 días de tratamiento.

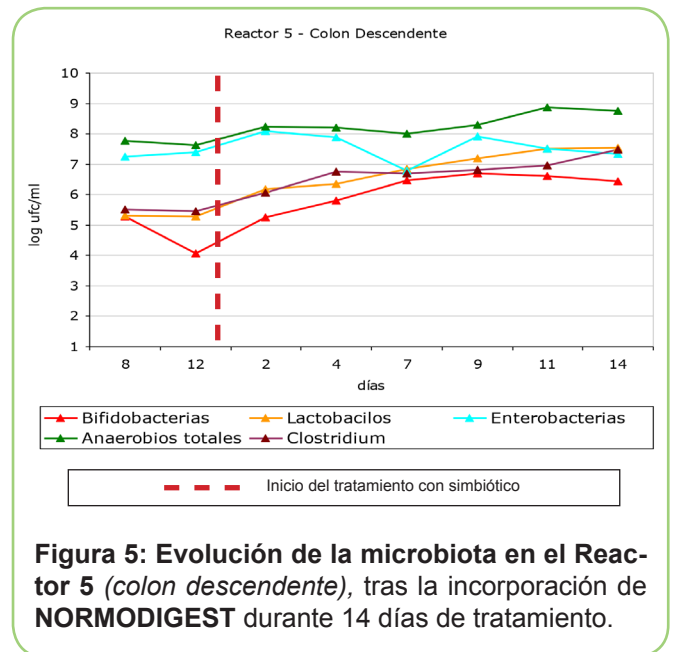
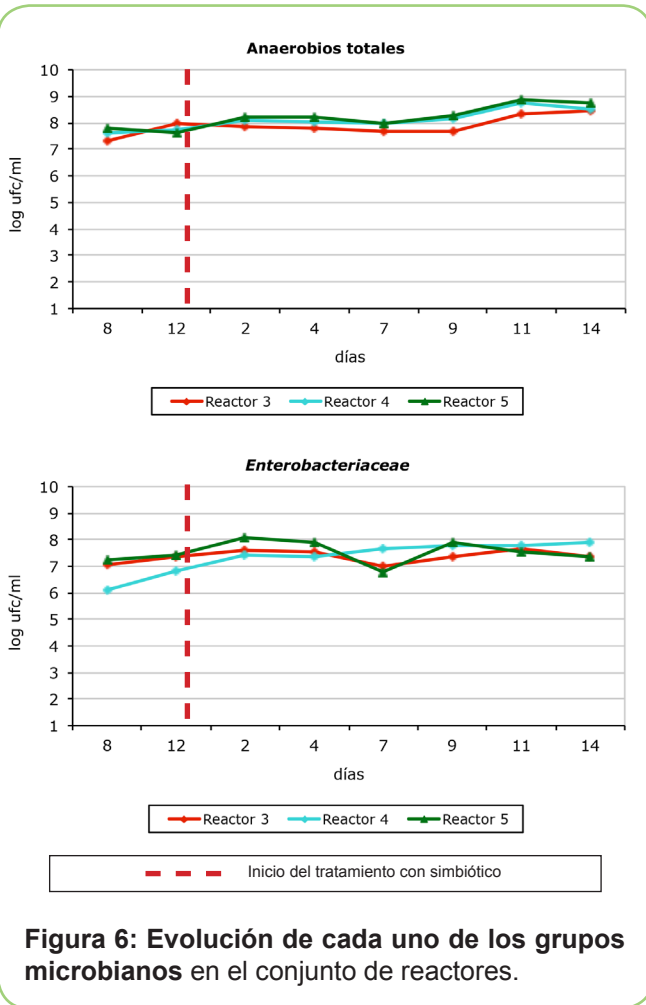


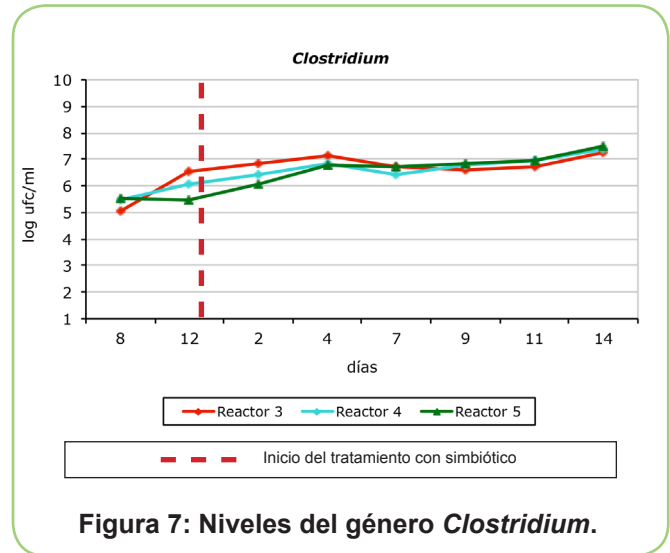
Figura 5: Evolución de la microbiota en el Reactor 5 (colon descendente), tras la incorporación de NORMODIGEST durante 14 días de tratamiento.

A continuación, para que pueda ser observada de modo más gráfica la **evolución de cada uno de los grupos microbianos** (Figura 6, 7, 8 y 9), se representa el crecimiento de los microorganismos por separado, en las tres porciones del colon (*ascendente: reactor 3; transversal: reactor 4; descendente: reactor 5*):



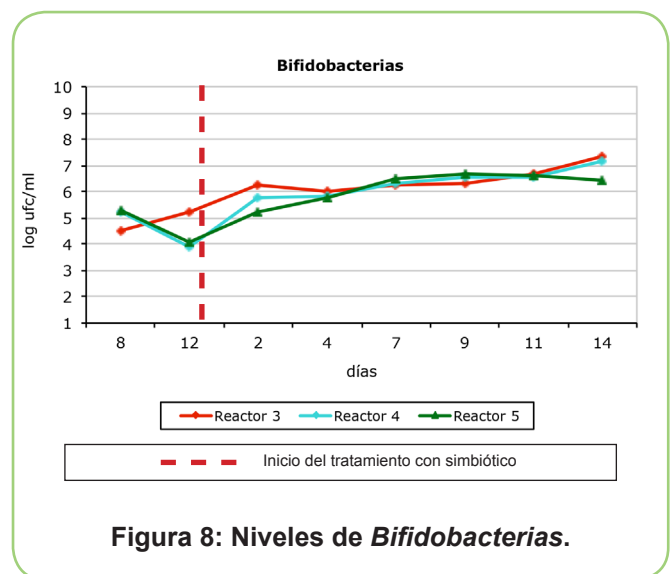
Durante el periodo de tratamiento y tras el periodo de estabilización, se ha llevado a cabo la incorporación de **1 vial de NORMODIGEST al día**. En este periodo, los microorganismos anaerobios y enterobacterias, indicadores de la flora intestinal total se mantienen estables respecto a los niveles basales en todas las porciones del colon, con un ligero incremento de los niveles de enterobacterias en el colon transversal. Ello indica que las condiciones son favorables para el desarrollo de la flora intestinal durante las dos semanas de incorporación del producto de interés (Figura 6).

Los niveles de **Anaerobios totales** se mantienen estables durante el tiempo de estudio (10^8 ufc/ml) y puede observarse un ligero incremento ($0.5-1$ log) en los días finales del tratamiento. El nivel de enterobacterias se mantiene estable en el primer y último Reactor, mientras que las condiciones del Reactor 4 parecen propiciar el incremento de los niveles de **Enterobacterias** en 1 ciclo logarítmico, posiblemente porque las condiciones de pH de este tramo favorecen este grupo microbiano.



Los niveles del género **Clostridium** (Figura 7) también se incrementan ligeramente durante el tiempo de estudio, acorde con el incremento de los niveles globales de anaerobios en el colon, siendo el colon descendente en el que se detecta un mayor incremento. El último tramo del colon con un pH más alto y una alta concentración de metabolitos, podría favorecer el crecimiento de este grupo microbiano.

Si analizamos en los tres tramos del colon el desarrollo de las **bacterias ácidolácticas** de los géneros **Bifidobacterium** y **Lactobacillus**, asociadas con la flora beneficiosa intestinal, por su capacidad de fermentación y producción de ácidos grasos de cadena corta se observan los resultados de las Figuras 8, 9.



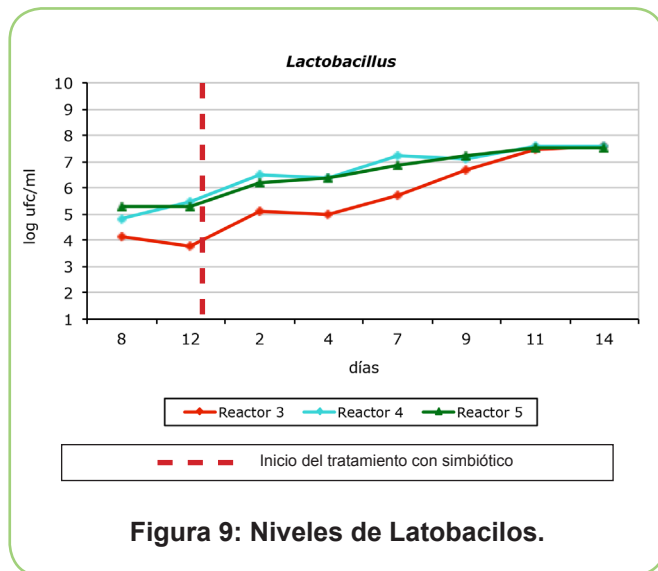


Figura 9: Niveles de Lactobacillus.

Por lo tanto, se detecta un **incremento de los niveles de bifidobacterias y lactobacilos** en las tres porciones del colon, que superan los dos ciclos logarítmicos en el caso de las Bifidobacterias y llegan a incrementarse más de 3 logaritmos, en el caso del género *Lactobacillus*. Estos resultados evidencian que el tratamiento produce un aumento significativo de los niveles de bacterias lácticas en el colon, y por tanto, se pone en evidencia el **efecto beneficioso** de la incorporación del simbiótico en la microbiota intestinal.

4. Conclusiones

Con respecto a los ensayos de fermentación colónica con **NORMODIGEST**, las principales conclusiones son las siguientes:

Resistencia gástrica y gastrointestinal. La digestión gástrica afecta levemente a la viabilidad de la bifidobacteria. La digestión intestinal provoca un descenso en la concentración del probiótico hasta niveles, en algunos casos, no detectables con la técnica analítica. Por ello, consideramos recomendable que la ingesta del probiótico se realice en ayunas. Por otro lado, la incorporación de mayor cantidad de simbiótico en la muestra de referencia no da lugar a una mayor viabilidad de la bifidobacteria tras la digestión gastrointestinal.

Fermentación colónica. El consumo en ayunas del simbiótico supone un menor tiempo de exposición de la bifidobacteria al pH ácido del estómago (*60 minutos vs. 120 minutos*) y la no exposición a la digestión intestinal. Debido a ello, se ha observado que tras el proceso de digestión gástrica las Bifidobacterias tienen una alta viabilidad.

Respecto a la evolución de la microbiota intestinal en los tres reactores del colon, se observa que la incorporación de 1 vial de **NORMODIGEST** al día tiene una **influencia notable** en la flora fecal humana, ya que produce una **mejora de los niveles generales de microflora fecal**, sobre todo de aquellos grupos microbianos con efecto beneficioso en el colon humano.

5. Bibliografía

- Alander, I De Smet, L Nolle, W Verstraete, A von Wright, T Mattila-Sandholm (1999). **The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)**. International Journal of Food Microbiology. 46, 1-12: 71-79.
- Anson NM, Selinheimo E, Havenaar R, Aura AM, Mattila I, Lehtinen P, Bast A, Poutanen K, Haenen GR. (2009). **Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds**. J Agric Food Chem. 2009 Jul 22;57(14):6148-55.
- Barberá, R. and Farré, R. **Biodisponibilidad de los elementos traza**. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. (1992) 32, 381-399.
- Bermúdez-Soto, M.-J. Tomás-Barberán, F.-A. García-Conesa. M.-T. 2007. **Stability of polyphenols in chokeberry (Aronia melanocarpa) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion**. Food Chemistry 102, 865-874.
- Bouayed J., Hoffmann, L., Bohn. T. **Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake**. Food Chemistry 128 (2011) 14-21.
- Bounhik Y, Pochart P, Marteau P, Arlet G, Goderel I, Rambaud JC. 1992. **Fecal recovery in humans of viable Bifidobacterium sp ingested in fermented milk**. Gastroenterology. Mar;102(3):875-8.
- Brassart D, Schiffrin EJ. 1997. **The uses of probiotics to reinforce mucosal defense mechanisms**. Trends Food Sci. Technol. 1997;8:321-326.
- Cámara, F., Amaro, M.A., Barberá, R., Clemente, G. 2005. **Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods**. Food Chemistry 92, 481-489.
- Clydesdale, F.M.; Chi Tan Ho; Lee, C.Y.; Monday, M.I. y Shewfelt, R.L. **The effects of postharvest treatment and chemical interactions on the bioavailability of ascorbic acid, thiamine, vitamin A, carotenoids and minerals**. Crit. Rev. Food Sci., (1991) 30, 599-638.
- Conway PL (1995) **Microbial ecology of the human large intestine**. In: Gibson GR, Mcfarlane GT (eds) **colonic bacteria: role in nutrition, physiology, and pathology**. CRC, London, pp 1-24.
- Courraud. J; Berger, J., Cristol, J.P., Avallone, S. 2013. **Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion**. Food Chemistry 136, 871-877.
- Cueva Sánchez. **Vino y salud: mejora de la calidad sanitaria del vino por hongos de la vid y modulación de la microbiota humana por polifenoles del vino**. Tesis doctoral. CSIC/CIAL. 2011. Facultad de Ciencias Departamento de Química-Física Aplicada. Madrid.
- Cummings, J.H., Bingham, S.A., Heaton, W., Eastwood, M.A. **Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber)**. Gastroenterology (1992) 103, 1783-1789.

- Charteris, W.P. Kelly, Morelli P.M. L. and Collins J.K. 1998. **Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiótico Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract.** Journal of Applied Microbiology 1998, 84, 759–768.
- Dall'Asta M, Calani L, Tedeschi M, Jechiu L, Brighenti F, Del Rio D. (2012). **Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources.** Nutrition. 28(2): 197-203.
- Davidsson, L. (1994): **Mineral and trace elements in infant nutrition.** Acta Paediatr. Scand. Suppl.395, 38-42.
- De Boever, P., B. Deplancke and W. Verstraete, 2000. **Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder.** J. Nutr., 130: 2599.
- De Boever P, Wouters R, Verstraete W. (2001). **Combined use of Lactobacillus reuteri and soygerm powder as food supplement.** Lett Appl Microbiol. 33 (6): 4, 20-4.
- Engelmann, M.D.M.; Davidsson, L; Sandström, B.; Walczyk, T.; Hurrell, R.F.; Michaelsen, K.F. (1998): **The influence of meat on nonheme iron absorption in infants.** Pediatric Research, 43 (6), 768-773
- Espín, J.C., Barberá, R. (2009). **Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells.** Food Chemistry 114: 813–820.
- European Food Safety Authority: **Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of silicon.** The EFSA Journal 2004, 60:1–11.
- Fairweather, S.J. (1992): **Bioavailability of trace elements.** Food Chem., 43, 213-217.
- Fairweather-Tait, S.L. (1995): **Iron-zinc and calcium-Fe interactions in relation to Zn and Fe absorption.** Proceedings of the Nutrition Society 54, 465-473.
- Fairweather-Tait, S.J. (1996): **Bioavailability of dietary minerals.** Biochem. Soc. Trans. 24 (3), 775-780.
- Fairweather-Tait S.L. (1997). **"Minerals and trace elements-Summary"**.
- Frontela Sasetta, F. 2007. **Effect of phytase addition on in vitro mineral bioavailability from infant cereals.** Murcia.
- Gangloff, M.B.; Olahn, R.P.; Miller, D.D. y Van Campen, D. (1996): **Assessment of iron availability using combined in vitro digestion and Caco-2 cells culture.** Nutrition Research 16, 479-487.
- Gibson, G.R., Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. (1988): **Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of hofmangut bacteria.** Appl. Environ. Microbiol. 54, 2750–2755
- González-Sarrías, A., Espín, J. C, Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. (2009). **Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins.** Mol. Nutr. Food Res. 53, 686-698.
- Guarner, F. (2007): **Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad.** Nutr Hosp. 2007;22(Supl. 2):14-9.
- Han, O.; Failla, M.L.; Hill, A.D.; Morris, E.R. y Smith, J.C. (1994): **Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cellline.** Journal of Nutrition, 124, 580-587.
- Herold, G., Besemer, F., Rögler, D. (1994): **Morphology of Caco-2 cells varies in different cell batches.** In vitro Cellular and Developmental Biology 30: A, 289-291.
- Hidalgo, U.; Raub, T.J. y Borchardt, R.T. (1989): **Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.** Gastroenterology 96, 736-749.
- Hollman PCH, Devries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. (1995). **Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers.** Am J Clin Nutr.;62:1276–82.
- Jugdaohsingh R, Reffitt DM, Oldham C, Day JP, Fifield LK, Thompson RPH. 2000. **Oligomeric but not monomeric silica prevents aluminum absorption in humans.** Am J Clin Nutr, 71(4):944–949.
- Klaenhammer and Kullen, 1999. **Selection and design of probiotics.** International Journal of Food Microbiology, 50, 45-57.
- Klingberg TD1, Budde BB. 2006. **The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage.** Int J Food Microbiol. 25;109(1-2):157-9.
- Lankaputhra, W. E. V., a Shah, N. P. (1995). **Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium species in the presence of acid and bile salts.** Cultured Dairy Products Journal, 30(3), 113–118.
- Linghong Liang, Xiangyang Wu, Ting Zhao, Jiangli Zhao, Fang Li, Ye Zou, Guanghua Mao, Liuqing Yang. 2012. **In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (Morus atropurpurea Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion.** Food Research International 46, 76–82.
- Mainville, I., Y. Arcand and E.R. Farnworth, 2005. **A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics.** Inter. J. Food Microbiol., 99: 287-296.
- Marteau P, Pochart P, Flourié B, Pellier P, Santos L, Desjeux JF, Rambaud JC. (1990). **Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum on metabolic activities of the colonic flora in humans.** Am J Clin Nutr. 52(4): 685-8.
- 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.
- Marteau, P. Minekus, Havenaar, M.R. Huis In't Veld, J.H.J. (1997). **Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile.** J Dairy Sci 80:1031–1037.
- Marzorati, M. et al. (2010) **In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements.** Int. J. Food Microbiol. 139, 168–176.
- Miller, D.D.; Schrickler, B.R.; Rasmussen, R.R. y Van Campen, D. (1981): **An in vitro method for estimation of bioavailability from meals.** Am. J. Clin. Nutr., 34, 2248-2256.
- Minekus, M.; Marteau, P.; Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1995) : **A multi compartmental dynamic computercontrolled model simulating the stomach and small intestine.** ATLA 23, 197-209.
- Molly, K., VandeWoestyne, M., Verstraete, W. (1993): **Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 254–258.
- Molly, K., Vande Woestyne, M., De Smet, I., Verstraete, W. (1994): **Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (shime) reactor using microorganism-associated activities.** Microb. Ecol. Health Dis. 7, 191–200.
- Nollet L, Vande Velde I, Verstraete W (1997) **Effect of the addition of Peptostreptococcus productus ATCC35244 on the gastro-intestinal microbiota and its activity as simulated in an in vitro simulator of the human gastro-intestinal tract (SHIME).** Appl Microbiol Biotechnol 48: 99-104.
- Oomen, A. G. Rempelberg, C. J. M. Bruil, M. A. Dobbe, C. J. G. Pereboom, D. P. K. H. Sips, A. J. A. M. 2003. **Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44, 281–287.
- P. Kontula á J. Jaskari á L. Nollet á I. De Smet A. von Wright á K. Poutanen á T. Mattila-Sandholm. **The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota.** Appl Microbiol Biotechnol (1998) 50: 246-252.

- Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P. y Rambaud, J.C. (1992). **Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion.** American Journal of Clinical Nutrition 55, 78–80.
- Possemiers, Selin Bolca, Willy Verstraete, Arne Heyerick. **The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals.** Fitoterapia 82 (2011) 53–66
- Reddy, M.B.; Chidambaram, M.V.; Fonseca, J. y Bates, G.W. (1986): **Potential role of in vitro iron bioavailability studies in combating iron deficiency: a study of the effects of phosvitin on iron mobilization from pinto beans.** Clinical Physiology and Biochemistry 4, 78-86.
- Saura-Calixto F, Pérez-Jiménez J, Touriño S, Serrano J, Fuguet E, Torres JL, Goñi I. **Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma.** Mol Nutr Food Res. 2010 Jul;54(7):939-46.
- Seeram, N. P., Aronson, W. J., Zhang, Y., Henning, S. M., Moro, A., Lee, R. P., et al. (2007). **Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 7732–7737
- Serra, A., Macl, A., Romero, M.P., Anglés, N., Morelló, J.R., Motilva, M.J. (2011). **Metabolic pathways of the colonic metabolism of procyanidins (monomers and dimers) and alkaloids.** Food Chem. 126: 1127-1137.
- Shen, L.H., Luten, J., Robberecht, H. Bindels, J. And Deelstra, H. (1994): **Modification of an in vitro method for estimating the bioavailability of ziac and calcium from foods.** Z. Lebensm. Unters. Forsch. 199(6). 442-445.
- Tannock, GW. (2000). **The intestinal microflora: potentially fertile ground for microbial physiologists.** Adv Microb Physiol. 42: 25-46.
- Van de Wiele TR1, Oomen AG, Wragg J, Cave M, Minekus M, Hack A, Cornelis C, Rempelberg CJ, De Zwart LL, Klinck B, Van Wijnen J, Verstraete W, Sips AJ. 2007. **Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract.** J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 42(9):1203-11.
- Van den Abbeele, P., Grootaert, C., Possemiers, S., Verstraete, W., Verbeken, K., and Van de Wiele, T. (2009) **In vitro model to study the modulation of the mucin-adhered bacterial community.** Appl Microbiol Biotechnol 83: 349–359.
- Vaughan, E.E., deVries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., (2002). **The intestinal LABs.** Antonie van Leeuwenhoek 82:341–352.
- Vélez, Dinoraz; Torres-Escribano, Silvia; Montoro, Rosa. **Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish.** Food Additives and Contaminants 27, 03 (2010) 327-337.
- Wolters, M.G.E.; Schreuder, H.A.W.; Vandeneuvel, G.; Vanlonkhuijsen, H.J.; Hermus, R.J.J. y Voragen, A.G.J. (1993): **A continuous in vitro method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods. Application to breads varying in phytic acid content.** Br. J. Nutr., 69 (3), 849-861.
- Zárate E, L, Fry J, Frankel G, Moseley SL, Baudry B, Kaper JB, et al. J Nutr. 2000 Feb; 130(2S Suppl):432S-436S. [J Nutr. 2000].



derbós

Laboratorio Dietético Derbós, S.L. - Polígono Industrial Les Mases | Avda. Les Mases, s/n - parcela 10 D - 46725 RÒTOVA (Valencia) ESPAÑA

www.derbos.es
