

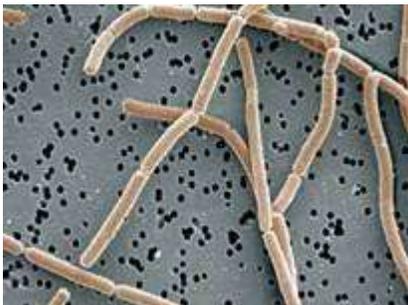
## CRITERIOS DE CALIDAD DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y EVIDENCIAS SOBRE EFECTOS HIPOCOLESTEROLÉMICOS

Fabián González Rivas<sup>1,2</sup> y Blanca Edelia González-Martínez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, España)

<sup>2</sup> Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León. (Nuevo León, México)

E-mail: fabito@hotmail.com



### Introducción

En 1907 el biólogo ucraniano y premio Nóbel, Elie Metchnikoff, después de descubrir la bacteria *Lactobacillus bulgaricus* y dedicar la última década de su vida al estudio de las bacterias ácido-lácticas, llega a la conclusión de que el consumo de productos que contengan estas bacterias alarga la vida (1). Por lo que al revisar la historia nos damos cuenta que la aparente innovación que supone el recomendar el consumo de alimentos con microorganismos vivos por sus efectos beneficiosos no es más que el resultado de recuperar un concepto que ya existía, al menos desde comienzos del siglo XX. Concepto

que se había perdido hasta hace menos de dos décadas (2). Originalmente el término probiótico se utilizaba para designar sustancias imprescindibles para tener una buena salud (3). No fue hasta 1989 cuando, Fuller acuñó el término probiótico para nombrar exclusivamente a aquellas bacterias vivas que ingeridas mejoran la flora intestinal (4).

Los efectos beneficiosos de los alimentos funcionales están expresados bien directamente por la interacción de microorganismos vivos, bacterias o levaduras, con el huésped o bien indirectamente como resultado de la ingestión de los metabolitos microbianos producidos durante el proceso de fermentación (5). Las evidencias científicas indican que la ingestión de ciertos cultivos microbianos ejercen beneficios en la salud, no sólo en el tracto gastrointestinal sino también en el respiratorio y en el urogenital (6), así como en la modulación del sistema inmune (7). Los mecanismos de acción de los probióticos son múltiples y cada probiótico puede tener funciones específicas que afecten al huésped (8), si bien los detalles moleculares de los mecanismos de los probióticos todavía se tienen que descubrir (9). La mayoría de las bacterias conocidas como probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas, bacterias que se utilizan para la elaboración de productos fermentados (10).

El objeto del presente trabajo no es dar una visión general del conocimiento actual sobre probióticos, para lo cual ya hay múltiples revisiones, sino centrar el tema en cuales son los parámetros principales que caracterizan a un microorganismo para ser considerado como probiótico. Así como revisar los conocimientos sobre los efectos de estos microorganismos frente a los niveles de colesterol plasmático, aspecto de los menos estudiados de entre todos los efectos beneficiosos de los probióticos conocidos hasta la fecha.

Esta revisión en ningún momento pretende penetrar en el aspecto fundamental de las evaluaciones de seguridad que deben cumplir estos microorganismos antes de su comercialización. Tema que se planteará en una futura revisión.

### Crterios para la selección de probióticos

El tracto gastrointestinal contiene más de 500 tipos de bacterias diferentes (11), algunas de las cuales tienen importantes implicaciones en la salud (12,13). La mayoría de los probióticos son normalmente bacterias lácticas o Bifidobacterias, pero algunos géneros nuevos se están evaluando para el futuro (14). Estudiar cuales de estas bacterias tienen propiedades beneficiosas es de suma importancia económica y socialmente para la industria alimentaria y la salud pública respectivamente.

La metodología utilizada para seleccionar las diferentes cepas de bacterias susceptibles de ser caracterizadas como probióticos debe evaluar ciertos criterios para asegurar las características funcionales una vez en el interior del organismo.

Estos criterios deben basarse, como es lógico, en su capacidad de llegar vivos al intestino, por eso no debe sorprender que los principales criterios a evaluar en los candidatos a probióticos sean la resistencia al ácido del estómago y a las sales biliares del intestino (15,16).

a. Estabilidad en el paso por el estómago:

La mayoría de los microorganismos caracterizados como probióticos no han sido sometidos a pruebas de resistencia frente a ácidos. Estas pruebas son imprescindibles ya que las respuestas varían de una especie a otra (17). El pH del estómago es de 1.5 (18) y, según Berrada y cols. (19), el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago son 90 minutos. Por lo que, según Chou y Weimer, en su trabajo publicado en 1999, las pruebas in vitro de resistencia de microorganismos susceptibles de ser catalogados como probióticos deben verificar que son capaces de resistir ese tiempo y pH sin perder viabilidad (20). Varios estudios han demostrado que la matriz de alimentos consumidos juntamente con los probióticos pueden tener un efecto protector frente a los ácidos del estómago (21).

b. Resistencia a las sales biliares:

Sin embargo, el pH ácido del estómago, no es el único impedimento con el que se encuentran los microorganismos candidatos a llegar vivos al intestino para ejercer allí su efecto beneficioso en el huésped. En el intestino delgado, el obstáculo más importante para los microorganismos son las sales biliares (22), por lo que los probióticos para ejercer sus efectos beneficiosos no deben sucumbir a la acción de este bactericida natural (23). La concentración de sales biliares en el intestino humano son variables y difíciles de predecir (24). Las transformaciones microbianas de los ácidos y sales biliares son numerosas. Entre ellas destaca la hidrólisis, reacción muy habitual en el tracto intestinal de los animales (25). En este sentido una de los microorganismos más estudiados es *Lactobacillus reuteri*. Esta bacteria tiene la capacidad de desconjugar las sales biliares y así inactivar su potente acción biocida (26). Mecanismo utilizado por la mayoría de las bacterias resistentes a estas sales y que es uno de los factores de disminución del colesterol plasmático (27,28). Para mejorar la resistencia al paso por el estómago y primera parte del intestino de los probióticos, Stanton y cols., (29) recomiendan someterlos a condiciones de estrés subletal, como tratamiento con ácidos o calor, que les provoca la expresión de genes de respuesta adaptativa al estrés que los hacen más resistentes.

c. Capacidad de adhesión al intestino:

La capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino es un importante criterio para los probióticos ya que sólo las cepas que se puedan adherir podrán llevar a cabo una colonización efectiva (30) y ejercer los efectos beneficiosos que proveen los probióticos en su interacción con el huésped (31,32). Es más, según Reid y cols. (33) la capacidad de adhesión es un factor más importante que el tamaño de la bacteria a la hora de competir con el resto de la flora. Sin adhesión a la mucosa intestinal, la concentración de probióticos sería diluida hasta un nivel insignificante después de una comida o bebida (34). Además, se sabe desde hace tiempo que muchos patógenos no pueden ejercer su efecto dañino en el intestino hasta que no se han adherido (35), por lo que el hecho de tener una colonización protectora del intestino va a prevenir la adhesión de posteriores patógenos. El desarrollo de una microbiota favorable dependerá de la especificidad de las bacterias y de las adhesinas por los receptores del intestino y de la concentración de la competencia de otras bacterias presentes (36). En el intestino delgado la comunidad microbiana es más pequeña en número y diversidad que en el colon. En el colon encontramos recuentos superiores a  $10^{11}$  bacterias por gramo de contenido intestinal (37). Las biopsias intestinales son, según Tuomola y cols. (38) y Zoetendal y cols. (39), el mejor método de obtener información sobre la adhesión de los microorganismos en el intestino. Ya no sólo porque es una evaluación in vivo sino porque es la mejor aproximación para saber en que parte del intestino se produce la adhesión, lo cual es importante de cara a la estimulación del sistema inmune mediante el suministro vía oral de probióticos.

d. Viabilidad durante el procesado y el almacenamiento en refrigeración:

Los probióticos tienen que ser microorganismos que además de cumplir con los requisitos anteriormente mencionados deben ser capaces de soportar las condiciones de la producción industrial y mantener gran parte de su viabilidad durante el almacenamiento, en muchas ocasiones en refrigeración o congelación (40,41). De no ser así, de nada servirá que un alimento contenga un/os microorganismo/s promotores de la salud del consumidor ya que no podrá ejercer sus efectos beneficiosos por estar lesionados o muertos.

## Efectos sobre el colesterol plasmático

Hace más de 20 años que Gilliland y cols. (42) estudiaron la capacidad de *Lactobacillus acidophilus* para reducir el colesterol plasmático mediante la degradación del mismo y la desconjugación de sales biliares in vitro. Por aquel entonces ya se sabía que las sales biliares se sintetizan en el hígado a partir de colesterol desde donde son secretadas por la vesícula biliar al duodeno de forma conjugada en una cantidad que va de 500 a 700 ml por día (43). Lo que implica que si se desconjugan sales biliares el organismo tiene que hacer el esfuerzo de una producción incrementada consumiendo colesterol endógeno.

Otros estudios posteriores indican que efectivamente algunos microorganismos presentes en el intestino humano tienen capacidad de disminuir el colesterol plasmático (44), especialmente las bacterias ácido-lácticas, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium spp.* tienen la capacidad de metabolizar el colesterol (45).

Los estudios, in vitro, llevados a cabo por Pereira, D.I.A. en 2003, con *L. fermentum* KC5b concluyeron que esta cepa era una gran productora de ácidos grasos de cadena corta, especialmente de propionato, además de tener capacidad de desconjugar sales biliares, lo que la convierte en una candidata a ser considerado un probiótico con propiedades hipocolesterolémicas, a falta de la comprobación in vivo (46).

La capacidad de algunos probióticos, en este caso, *L. acidophilus* ATCC 4962 y *L. casei* ATCC 292, para degradar las sales biliares y generar ácidos grasos de cadena corta, se ve incrementada en presencia de ciertos prebióticos como manitol, fructo-oligosacáridos e inulina en pruebas in vitro (47,48, 49).

Los estudios in vitro son la primera parte del estudio y siempre se deben corroborar in vivo ya que estas condiciones pueden variar sustancialmente respecto a los estudios de laboratorio.

Los próximos años nos deparan gran cantidad de estudios en la línea de Pereira (50), con nuevas cepas candidatas. Que irán ineludiblemente seguidas de estudios posteriores de corroboración de resultados en humanos.

Hay pocos estudios in vivo sobre los efectos de los probióticos en relación con el colesterol y sus resultados son ambiguos. Así por ejemplo el estudio de Greany (51), indica que el efecto de los probióticos sobre el colesterol en mujeres menopáusicas es despreciable. Mientras que otros nos muestran resultados ambiguos en lo que respecta a los efectos sobre el colesterol plasmático donde se combinan probióticos con prebióticos (52).

## Consumo de probióticos, ¿esporádico o continuo?

Después de leer el apartado en el que se habla de la capacidad de los probióticos de adhesión al intestino, del presente artículo, se podría suponer que con el consumo durante un periodo más o menos breve de grandes cantidades de probióticos sería suficiente para conseguir una flora intestinal saludable, con efectos preventivos e incluso terapéuticos. Sin embargo se sabe que la microbiota de los recién nacidos se desarrolla rápidamente durante la primera semana de vida, siendo inestable y variable a lo largo del primer año de vida, para estabilizarse a partir de ahí. Por lo que, esta primera etapa, puede ser el momento crucial para establecer una microbiota saludable ya que después, debido a la estabilidad de la flora, se torna más complicada su modificación (53).

Algunos estudios como el de Kullen y cols., en 1997, quienes alimentaron a voluntarios con una única cepa de Bifidobacteria, apreciaron que mientras el suplemento microbiano se suministraba, esta se encontraba en heces y desaparecía al poco de suprimirse (54). Lo que indica que, aunque la bacteria es capaz de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal, no es capaz de colonizar el intestino. En esa línea se manifiesta la revisión de Bezkorovainy (55) quien advierte que ningún estudio ha mostrado que el consumo de probióticos suponga un cambio persistente en la flora del huésped. Incluso compañías dedicadas a la producción de alimentos con fermentos vivos aseguran que el consumo debe ser frecuente si se quiere obtener una mejora en las propiedades de la flora intestinal (56). Y, aunque no se conocen las dosis efectivas de cada una de las cepas en particular, se sabe que estas deben ser consumidas en grandes cantidades para que tengan efecto en el huésped (57). Algunas organizaciones internacionales, como la *Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association*, con sede en Japón, donde el mercado de probióticos está más desarrollado, proponen una concentración mínima de  $10^7$  ufc/ml de producto para que se generen los efectos benéficos a la salud de los

consumidores, otras sin embargo, como la estadounidense *National Yogurt Association* (NYA) exigen un mínimo de  $10^8$  ufc/g en el momento de la producción para poder ser calificado el producto como “Producto con cultivos vivos y activos” (58). De acuerdo a lo propuesto por Sanders y Huis in't Veld (59) es necesaria la ingestión de una dosis mínima diaria de  $10^9$  a  $10^{10}$  para que puedan ser observados los efectos en la salud.

Como indican Salminen y cols. (60), un probiótico, para ser efectivo, debe residir en el lugar adecuado durante un tiempo suficientemente elevado a concentraciones elevadas. De este modo si lo que se pretende es actuar sobre los niveles de colesterol plasmático, después de todo lo indicado, parece claro que sin la presencia del microorganismo estos efectos no se van a producir. Por lo que si los estudios más recientes indican que los probióticos raramente consiguen modificar permanentemente la flora intestinal, parece claro indicar que el consumo de probióticos debe ser continuo en el tiempo para obtener este y otros beneficios que proporcionan estos microorganismos (61).

## Conclusiones

El sobrepeso y la obesidad son importantes factores de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, lo cual es la primera causa de muerte con 17 millones de muertes cada año (62). Los probióticos se han demostrado efectivos en la prevención y curación de numerosas enfermedades. Si entre ellas están los problemas relacionados con el colesterol estaremos ayudando a una buena parte de la población del primer mundo.

Como indican Salminen y cols (63) y Tuomola y cols., (64) los microorganismos que se pretendan utilizar como probióticos deben ser capaces de resistir el bajo pH del estómago y las sales biliares del intestino. Esta resistencia a las sales biliares, es la que les confiere, en la mayoría de los casos, su efecto hipocolesterolémico ya que para ello desconjugan las sales biliares inactivándolas. A lo anterior hay que añadir la capacidad de adhesión a la mucosa intestinal y producir sustancias antimicrobianas que contribuyan a mejorar la salud del huésped inhibiendo a los patógenos (65).

Para que estos microorganismos puedan llegar al consumidor deben resistir procesos de producción industrial y de mínima pérdida de viabilidad durante su almacenamiento, principalmente en condiciones de refrigeración (66, 67). Todo esto hace que las pruebas de selección de microorganismos candidatos sean muy restrictivas y sólo unos pocos de ellos puedan ser considerados realmente probióticos, según los parámetros científicos establecidos con el conocimiento que se tiene hoy en día.

Actualmente la información que se dispone sobre la actividad hipocolesterolémica de las cepas se centra en estudios in vitro, por lo que hay que esperar posteriores estudios que confirmen que realmente el consumo regular de ciertos microorganismos, entre otros beneficios, produce una disminución de los niveles de colesterol plasmático y que fracciones de este disminuye; si todas, sólo LDL (“colesterol malo”) o sólo HDL (“colesterol bueno”).

Este es el futuro más próximo. Si bien ya se están abriendo nuevas líneas con la vista puesta en el siguiente paso lógico. Una vez conocidas las propiedades beneficiosas de los microorganismos ya identificados, el camino pasa por generar recombinantes para añadirle alguna característica extra y conseguir así microorganismos con propiedades mejoradas. En esta dirección trabajaron Granato y cols. en 2004 quienes demostraron mediante la introducción de un gen de *L. johnsonii* que codifica para una adhesina introducido en *E. coli* que efectivamente esa era una de las proteínas que mediaba en la adhesión de este probiótico al intestino (68).

En los últimos años el conocimiento de la interacción probióticos-huésped ha dado un salto cuantitativo importante. Sin embargo todavía quedan muchos aspectos por aclarar. Por lo que la investigación en éste área, lejos de estar llegando a su fin, a penas está alcanzando la madurez.

## Resumen

En los últimos años se ha observado un desarrollo muy importante del mercado de los alimentos funcionales que portan microorganismos vivos. Estos productos son muy interesantes desde el punto de vista económico, ya que en la mayoría de los casos son leches fermentadas, que al contener algún microorganismo adicional, se les puede incrementar el precio dejando un interesante margen al productor. Sin embargo en muchos casos estos nuevos microorganismos no cumplen unos mínimos aspectos de calidad que aseguren su

funcionalidad y efectos beneficiosos en el consumidor, por lo que este paga más para obtener lo mismo. Esta revisión pretende plantear cuales son, según los conocimientos científicos actuales, las pruebas de calidad que estos microorganismos deben superar antes de ser considerados como probióticos y por tanto incluidos en alimentos y publicitados como funcionales. Siempre partiendo de la base que han superado las pruebas previas de seguridad, básicamente las de inocuidad. A su vez en la presente revisión se plantea la funcionalidad de estos microorganismos haciendo hincapié en la reducción del colesterol plasmático.

*Palabras clave: Probióticos, pruebas de calidad, colesterol.*

### **Abstract**

Functional food with live microorganisms market has been developed a lot in the last few years. These products have a great economical importance for food industry in order to leave a big profit rate that traditional fermented milk doesn't do. However in most cases these microorganisms not acquire minimum quality standards that guarantee its functionality and health benefits for consumers. In other words, consumers are paying more for the same product. This is a review of the quality probes, in order to the present scientific knowledge, that a microorganism need to excel before they can be named "Probiotic", introduced in foods and advertising as functional. In all cases safety probes must be taken before and this review do not study safety rules. Moreover this paper learns about of probiotics capability for reduce plasmatic cholesterol.

*Key words: Probiotics, quality test, cholesterol*

### **Referencias**

1. Anonymous. The Columbia Encyclopedia, 6th Ed. 2001. New York, Columbia University Press.
2. Meurman, J.H. 2005, Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry?: Eur J Oral Sci, v. 113, p. 188-196.
3. Guarner F, G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko and L. Morelli 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? Br J Nutr. Jun;93(6):783-6
4. Fuller, R. 1989, Probiotics in man and animals.: J. Appl. Bacteriol., v. 66, p. 365-378.
5. Stanton, C, P Ross, G F Fitzgerald and D Van Sinderen 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites.: Current Opinion in Biotechnology, v. 16, p. 198-203.
6. *Idem.*
7. Isolauri, E, S Rautava, M Kalliomaki, P Kirjavainen and S Salminen, 2002, Role of probiotics in food hypersensitivity.: Current Opinion Allergy Clin Immunol., v. 2, p. 263-271.
8. Salminen, S.P., M Gueimonde and E Isolauri, 2005, Probiotics that modify disease risk.: J. Nutr., v. 135, p. 1294-1298.
9. Saxelin, M, S Tynkkynen, T Mattila-Sandholm and W M de Vos 2005, Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms.: Current Opinion in Biotechnology, v. 16, p. 204-211.
10. Yakult, 2005. <http://www.yakult.com.mx/lactobacilo.php>
11. Bengmark, S, 1998, Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora.: Gut, v. 42, p. 2-7.
12. *Idem.*

13. Ouwehand, A.C., M Derrien, W de Vos, K Tiihonen and N Rautonen, 2005, Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. : *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 212-217.
14. Salminen, S.P., *et. al.*, *Op. cit.*
15. Dunne, C., L O'Mahony, L Murphy, G Thornton, D Morrissey, S O'Halloran, M Feeney, S Flynn, G Fitzgerald, C Daly, B Kiely, G C O'Sullivan, F Shanahan and J K Collins, 2001, In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings.: *Am J Clin Nutr.*, v. 73 (suppl.), p. 386-392.
16. Stanton, C. *et.al.*, *Op.cit.*
17. Chou, L.S and B Weimer, 1999, Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*.: *J Dairy Sci.*, v. 82, p. 23-31.
18. Giannella, R.A., S.A. Broitman and N. Zamchech 1972 Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut*, 13: 251-256
19. Berrada, N., J F Lemeland, G Laroche, P Thouvenot and M Paia, 1991, *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit.: *J.Dairy Sci.*, v. 74, p. 409-413.
20. Chou, L.S and B Weimer, *Op. cit.*
21. Gardiner, C., C Stanton, P B Lynch, J K Collins, G Fitzgerald and R P Ross 2005, Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract.: *J Dairy Sci.*, v. 82, p. 1379-1387.
22. Bezkorovainy, A., 2001, Probiotics: determinants of survival and growth in the gut.: *Am J Clin Nutr.*, v. 73(suppl.), p. 399-405.
23. Chou, L.S and B Weimer, *Op. cit.*
24. Lankaputhra W.E.V. and N. P. Shah, 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp* in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 30:2-7.
25. Christiaens, H., R J Leer, P H Pouwels and W Verstraete, 1992, Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay.: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58(12), p. 3792-3798.
26. de Boever, P., R Wouters, L Verschaeve, P Berckmans, G Schoeters and W Verstraete, 2000, Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity.: *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 53, p. 709-714.
27. Gilliland, S.E., C R Nelson and C Maxwell, 1985, Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*.: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p. 377-381.
28. Pereira, D.I.A., A L McCartney and G R Gibson, 2003, An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties.: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69(8), p. 4743-4752.
29. Stanton, C. *et.al.*, *Op.cit.*
30. Merk, K., C Borelli and H C Korting, 2005, Lactobacilli – bacteria–host interactions with special regard to the urogenital tract.: *International Journal of Medical Microbiology*, v. 295, p. 9-18.
31. Chou, L.S and B Weimer, *Op. cit.*

32. Fuller,R, 1991, Probiotics in human medicine.: Gut, v. 32, p. 439-442.
33. Reid,G, R L Cook and A W Bruce, 1987, Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract.: J.Urol., v. 138, p. 330-335.
34. Salminen,SP, *et. al., Op. cit.*
35. Hoepelman,AI and E I Tuomanen, 1992, Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins.: Infection and Immunity, v. 60, p. 1729-1733.
36. Salminen,SP, *et. al., Op. cit.*
37. Ouwehand,AC, *et. al., Op. cit.*
38. Tuomola,E, R Crittenden, M Playne, E Isolauri and S Salminen, 2001, Quality assurance criteria for probiotic bacteria.: Am J Clin Nutr., v. 73 (supl), p. 393-398.
39. Zoetendal, E., Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. and W. de Vos. 2002. Mucosa associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from the faeces. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3401–3407.
40. Chou,LS and B Weimer, *Op. cit.*
41. Stanton,C. *et.al., Op.cit.*
42. Gilliland,SE, *et. al., Op. cit.*
43. Hofmann,AF, G Molino, M Milanese and G Belforte, 1983, Description and simulation of a physiological pharmacokinetic model for the metabolism and enterohepatic circulation of bile acids in man. Cholic acid in healthy man.: J Clin Invest., v. 71, p. 1003-1022.
44. Fukushima,M and M Nakano, 1996, Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet.: Br J Nutr., v. 76(6), p. 857-867.
45. de Smet,I, L Van Hoorde, M Vande Woestyne, H Christiaens and W Verstraete, 1995, Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli.: J Appl Bacteriol., v. 79, p. 292-301.
46. Pereira,DIA, *et al., Op.cit.*
47. Umeki, M, K Oue, S Mochizuki, Y Shirai and K Sakai, 2004, Effect of *Lactobacillus rhamnosus* KY-3 and cellobiose as synbiotics on lipid metabolism in rats.: J Nutr Sci Vitaminol, v. 50, p. 330-334.
48. Liong,MT and N P Shah, 2005 Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method.: Applied and Environmental Microbiology, v. 71, p. 1745-1753.
49. Liong,MT and N P Shah, 2005. Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructo-oligosaccharide and inulin: a response surface methodology approach.: J Appl Microbiol., v. 98, p. 1115-1126.
50. Pereira,DIA, *et al., Op.cit.*
51. Greany,KA, J A Nettleton, K E Wangen, W Thomas and M S Kurzer, 2004, Probiotic consumption does not enhance the cholesterol-lowering effect of soy in postmenopausal women.: J Nutr., v. 134, p. 3277-83.

52. Pereira,DI and G R Gibson, 2002, Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans.: *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 37, p. 259-281.
53. Salminen,SP, *et. al.*, *Op. cit.*
54. Kullen,MJ, M M Amann, M J O'Shaughnessy, D J O'Sullivan, F F Busta and L J Brady, 1997. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans.: *J Nutr.*, v. 127, p. 89-94.
55. Bezkorovainy,A, *Op. cit.*
56. Yakult, *Op.cit*
57. Stanton,C. *et.al.*, *Op.cit.*
58. Lourens-Hattingh, A. and BC Viljoen 2001 Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11 (1-2), p.1-17.
59. Sanders, ME and J. Huis in't Veld 1999, Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 76(1-4), p. 293-315.
60. Salminen,SP, *et. al.*, *Op. cit.*
61. Bezkorovainy,A, *Op. cit.*
62. World Health Organization (WHO), 2005. Rising threat of heart disease and stroke as overweight and obesity rapidly increase. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr44/en/>
63. Salminen,S, C Bouley, M C Boutron-Ruault, J H Cummings, A Franck, G R Gibson, E Isolauri, M C Mores, M Roberfroid and I Rowland 1998, Functional food science and gastrointestinal physiology and function.: *Br J Nutr.*, v. 80, p. 147-171.
64. Tuomola,E., *et.al.*, *Op. cit*
65. Merk,K, *et.al.*, *Op. cit.*
66. Chou,LS and B Weimer, *Op. cit.*
67. Stanton,C. *et.al.*, *Op.cit.*
68. Granato,D, G E Bergonzelli, R D Pridmore, L Marvin, M Rouvet and I E Corthesy-thelaz, 2004, Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucin.: *Infection and Immunity*, v. 72, p. 2160-2169.