

Evaluación de las propiedades probióticas de bacterias lácticas de origen enológico

A. García Ruiz, D. González de Llano, A. Esteban Fernández, T. Requena Rolanía, B. Bartolomé Sualdea, M.V. Moreno Arribas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, CIAL (CSIC-UAM). MADRID

RESUMEN

En este trabajo se ha evaluado la resistencia a la saliva, al medio ácido y a las sales biliares de once cepas de origen enológico pertenecientes a *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., y *Oenococcus oeni*, además de dos cepas probióticas de referencia. Las cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* mostraron una alta resistencia a la lisozima (> 80 %), y todas sobrevivieron a las sales biliares y a bajos valores de pH (pH 1.8), lo que sugiere una buena adaptación de estas cepas a las condiciones gastrointestinales. También se evaluó su capacidad para adherirse a la mucosa intestinal y para inhibir la adhesión de *Escherichia coli* a células epiteliales del intestino. En particular, la cepa *P. pentosaceus* CIAL-86 mostró un alto porcentaje de adherencia a las células intestinales (> 12 %), incluso superior al mostrado por las cepas probióticas de referencia, y una alta actividad anti-adhesión de *E. coli* CIAL-153 (> 30 %).

Palabras clave: Propiedades probióticas. Bacterias lácticas enológicas. Resistencia al tracto gastrointestinal. Adhesión/anti-adhesión Caco-2.

ABSTRACT

In this study, the saliva, acid and bile resistance of eleven enological strains of *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., and *Oenococcus oeni*, as well as two probiotic reference strains were evaluated. *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains showed high resistance to lysozyme (> 80 %) and all were capable of surviving at bile salts and low pH values (pH 1.8), suggesting a good adaptation to gastrointestinal conditions. The ability of these strains to adhere to the intestinal mucosa and the inhibition of the adhesion of *Escherichia coli* to intestinal cells were also evaluated. In particular, *P. pentosaceus* CIAL-86 showed a high percentage of adhesion to intestinal cells (> 12 %), even higher than that shown by the reference probiotic strains, and a high anti-adhesion activity against *E. coli* CIAL-153 (> 30 %).

Key words: Probiotic properties. Enological lactic acid bacteria. Gastrointestinal tract resistance. Adhesion/anti-adhesion Caco-2.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados probióticos se consideran como una parte importante del mercado de los alimentos funcionales, con un gran crecimiento tanto en volumen de ventas (60 a 70 % del total del mercado de alimentos funcionales) como en la variedad de productos que se ofertan (1).

Los microorganismos probióticos se definen como microorganismos no patógenos que cuando se consumen en cantidades adecuadas como parte de un alimento, confieren al huésped un beneficio para la salud (2). La mayoría de las cepas probióticas que se han estudiado y están en el

mercado han sido aisladas de productos lácteos así como de la microbiota intestinal, perteneciendo en su mayoría a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (3). Las bacterias lácticas (BAL) pueden considerarse el grupo bacteriano más numeroso ligado a los humanos. Se asocian de forma natural a superficies mucosas y al tracto gastrointestinal (GI), además de constituir una población autóctona en hábitats relacionados con alimentos, como plantas (frutas, vegetales, cereales), leche o carne, u otros en los que se añaden de forma intencionada para la elaboración de productos fermentados a partir de los sustratos anteriores.

Aunque la mayoría de las cepas probióticas que se comercializan proceden de productos lácteos, recientemente se ha comenzado a disponer de datos acerca de la

tolerancia al tránsito GI de bacterias de origen vegetal de los géneros *Leucosnostoc* y *Pediococcus* (4,5). También es destacable el primer estudio sobre las propiedades probióticas de una bacteria proveniente de una bebida alcohólica de origen vegetal, concretamente *Pediococcus parvulus* (6).

Las BAL del vino pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus*, siendo *O. oeni* la principal especie responsable de la fermentación maloláctica del vino. La ecología de este grupo bacteriano es compleja y se caracteriza por presentar un crecimiento favorable en medios hostiles como el vino, i.e. bajo pH (en torno a 3.5), escasa proporción de nutrientes y presencia de etanol. La resistencia a estos factores junto con la similitud estructural y funcional con otros grupos bacterianos probióticos convencionales, convierte a las BAL del vino en potenciales candidatos con efectos beneficiosos para la salud humana. Sin embargo, los primeros datos sobre su potencial probiótico se han publicado recientemente (7), y no existe un estudio sistemático que describa la disponibilidad de una colección de microorganismos de origen enológico que hayan sido caracterizados para determinar su posible aptitud como probióticos, evaluados además específicamente de forma que carezcan de propiedades que pongan en riesgo la seguridad alimentaria.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el potencial probiótico de BAL de origen enológico, incluyendo cepas

de diferentes géneros y especies. Para ello, se realizó un estudio *in vitro* de las cepas bacterianas seleccionadas con la finalidad de evaluar: a) su resistencia a las condiciones en el tracto GI; b) su adherencia a las células intestinales; y c) su efecto sobre la adhesión de bacterias patógenas a células epiteliales intestinales. Estos análisis se llevaron a cabo como primer paso hacia el establecimiento de criterios racionales para la detección y selección de microorganismos del vino con potenciales propiedades probióticas en humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias lácticas (BAL) del vino y medios de cultivo

Se seleccionaron once cepas de BAL enológicas pertenecientes a la colección del CIAL (Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CSIC-UAM), concretamente *Lactobacillus casei* (n = 3), *L. plantarum* (n = 1), *Pediococcus pentosaceus* (n = 4) y *Oenococcus oeni* (n = 3) (Tabla I). Estas bacterias fueron previamente aisladas de mostos y vinos tintos e identificadas por la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, tal y como se describe en Moreno-Arribas y Polo (8) y García-Ruiz y cols. (9). A su vez,

TABLA I
RESISTENCIA A LA LISOZIMA Y A LA BILIS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS ESTUDIADAS

	Resistencia a lisozima (% supervivencia)		Resistencia a la bilis (% crecimiento)				
	t_{30}	t_{120}	0.06 %	0.125 %	0.25 %	0.5 %	1 %
<i>Cepas enológicas</i>							
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-16	83.1	70.8	100	100	95.7	88.9	83.3
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-49	100	83.3	100	100	91.8	83.4	78.1
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-85	84.3	76.1	97.2	98.3	86.9	82.1	77.4
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-86	93.9	88.6	99.1	100	88.3	89.5	84.1
<i>L. casei</i> CIAL-51	75.0	78.6	96.0	94.8	92.9	77.3	61.7
<i>L. casei</i> CIAL-52	71.1	70.7	98.2	96.6	97.5	78.0	64.3
<i>L. casei</i> CIAL-92	100	88.6	97.7	96.0	91.1	87.1	80.4
<i>L. plantarum</i> CIAL-121	65.1	50.8	93.6	91.2	89.0	89.5	88.7
<i>O. oeni</i> CIAL-117	62.1	< 1.00	100	100	100	96.8	90.7
<i>O. oeni</i> CIAL-118	60.0	1.00	90.7	89.8	82.7	87.5	80.5
<i>O. oeni</i> CIAL-119	32.0	< 1.00	100	100	90.6	87.1	72.9
<i>Cepas de referencia</i>							
<i>L. plantarum</i> CLC 17	100	86.0	93.8	89.1	77.9	76.8	73.0
<i>L. fermentum</i> CECT5716	65.4	61.5	100	100	88.0	78.7	72.0

se emplearon dos cepas probióticas control, en concreto, *Lactobacillus plantarum* CLC 17 y *L. fermentum* CECT 5716 (10). Además para los estudios de inhibición de la adhesión a células Caco-2 se seleccionó la cepa *Escherichia coli* CIAL-153.

Los medios de cultivo empleados para las BAL fueron el medio MRS o MRS-Agar (pH 6.2 ± 0.2) excepto para las cepas de *O. oeni*, que se utilizó el medio MRS málico-fructosa (pH 4.8 ± 0.2) o MRS-cisteína-Agar. El medio empleado para el cultivo de la cepa de *E. coli* fue TSB o TSA.

ENSAYO DE RESISTENCIA AL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL

Resistencia a la lisozima

La resistencia a la saliva de las BAL se evaluó siguiendo el método descrito por Zago y cols. (11). La tasa de supervivencia se definió como el porcentaje (%) de UFC (unidades formadoras de colonias)/mL tras 30 y 120 min de incubación a 37 °C con saliva, en comparación con las UFC/mL a tiempo 0.

Tolerancia al jugo gástrico

La resistencia al pH gastrointestinal y la pepsina de las BAL se ensayó en una solución salina estéril suplementada con pepsina (0,3 %) e incubada a 37 °C. El pH de la solución (5.0, 4.1, 3.0, 2.1 y 1.8) se fijó gradualmente acidificando con HCl (1 M). Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 20, 40, 60 y 90 min) de incubación. Los resultados obtenidos a los diferentes tiempos de incubación y pH se expresaron como el log UFC/mL.

Resistencia a sales biliares

La resistencia a las sales biliares -1 %, 0.5 %, 0.25 %, 0.125 % y 0.06 % (v/v)- se determinó siguiendo el protocolo descrito por Vinderola y Reinheimer (12). El crecimiento bacteriano se monitorizó mediante la medida de absorbancia a 600 nm en un lector de placas Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, USA). Los resultados se expresaron como porcentaje de crecimiento respecto a un control en ausencia de sales biliares.

Ensayos en cultivos celulares

La línea celular Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y se utilizó en su estado de diferenciación terminal para simular a los enterocitos maduros del intestino delgado. Las células Caco-2 se cultivaron y mantuvieron en

medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado con un 10 % (v/v) de suero de ternera fetal, a 37 °C y en una atmósfera de 5 % de CO₂/95 % de aire a una humedad constante. Para los experimentos, las células Caco-2 se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 25.000 células/cm² y se cultivaron durante 15 días para obtener una monocapa de células diferenciadas y polarizadas.

Ensayos de adherencia a células Caco-2

La capacidad de adhesión de las BAL enológicas seleccionadas y *E. coli* CIAL-153 a las células Caco-2 se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Fernández de Palencia y cols. (13). Las bacterias de un cultivo *overnight* se centrifugaron (10.000 rpm, 10 min a 4 °C) y se resuspendieron en solución tampón de PBS (DPBS Lonza Walkersville, Inc., USA) a una concentración de 10⁸ UFC/mL.

Los ensayos de adhesión consistieron en la exposición de las células Caco-2 a las BAL y *E. coli* CIAL-153 (ratio 1:100) en atmósfera de 5 % CO₂ y 37 °C. Tras una hora de incubación se eliminaron las bacterias no adheridas, mediante lavados con DBPBS y, se despegaron las células Caco-2 con las bacterias adheridas incubando con 0.05 % tripsina-EDTA. Finalmente, se procedió a determinar el número de bacterias adheridas a las células Caco-2 mediante diluciones seriadas y siembra en placas en el medio de cultivo correspondiente.

Todos los ensayos de adhesión y recuentos en placa, se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como el porcentaje de bacterias adheridas (UFC/mL) con respecto al número total de bacterias inoculadas inicialmente (% Adhesión= [Bacterias adheridas/Total de bacterias inoculadas] x 100).

Ensayos de anti-adhesión de *E. coli* a células Caco-2 (competición, inhibición y desplazamiento)

La capacidad de las BAL del vino para competir, inhibir y desplazar la adhesión de *E. coli* CIAL-153 a la línea celular Caco-2 se realizó como se describe previamente con ligeras modificaciones. En el ensayo de competencia, la exposición de *E. coli* CIAL-153 a las células Caco-2 se realizó de forma conjunta con las BAL durante un periodo de una hora y los resultados se expresaron como el porcentaje de adhesión de *E. coli* CIAL-153 en presencia de BAL con respecto a la adhesión de dicha bacteria en ausencia de BAL. En referencia a los ensayos de inhibición y desplazamiento, la adición de *E. coli* CIAL-153 al cultivo de células Caco-2 se realizó una hora antes y una hora después a la exposición con BAL, respectivamente. Por su parte, los resultados de inhibición de la adhesión de *E. coli* CIAL-153 así como los de desplazamiento se expresaron como un porcentaje, entre la diferencia de

la adhesión de *E. coli* CIAL-153 a células Caco-2 en ausencia y presencia de BAL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la selección de microorganismos potencialmente probióticos un punto importante es la evaluación de su resistencia a las condiciones extremas del tracto GI. La primera barrera que deben superar es la boca, con una alta concentración de lisozima en la saliva humana, seguido del estómago, con bajo pH y presencia de enzimas digestivas (i.e., pepsina), y el intestino, que contiene bilis (14).

La tabla I muestra los resultados relativos de las BAL enológicas a la resistencia a la lisozima. Se puede observar la buena resistencia de las BAL no *O. oeni* a la lisozima, con porcentajes de supervivencia superiores al 50 % tras 120 minutos de exposición a dicha enzima. Las cepas *P. pentosaceus* CIAL-86 y *L. casei* CIAL-92 destacaron por exhibir las tasas de supervivencia más elevadas (88,6 %), con un valor similar e incluso superior a las bacterias probióticas control (Tabla I). Este resultado confirma

la alta resistencia a la lisozima de cepas del género la *Lactobacillus* observada por otros autores (11,15).

En relación a la resistencia al jugo gástrico, es importante destacar que no se observaron diferencias significativas en el recuento microbiano hasta alcanzar un pH inferior a 3. Este hecho en el caso de las BAL enológicas era esperable, ya que en el vino sobreviven en condiciones de pH próximas a 3.5. En referencia a los probióticos control, *L. plantarum* CLC 17 y *L. fermentum* CECT 5716, se observó un descenso de 1-2 unidades logarítmicas. En cuanto a las BAL enológicas, este descenso osciló entre 1 y 3 unidades logarítmicas destacando las cepas *L. casei* CIAL-51 y CIAL-52 por ser las más resistentes a las condiciones de acidez del estómago, con la disminución sólo de una unidad logarítmica. Esta buena adaptación al jugo gástrico también se ha observado en otras cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* (13,15-17) (Tabla II).

Se ha descrito que el rango de concentración de bilis en el intestino oscila entre 0.3 y 0.5 % (18). En ese rango de concentraciones biliares, las BAL analizadas mostraban un elevado porcentaje de crecimiento (> 75 %), destacando entre todas ellas la cepa *O. oeni* CIAL-117 (Tabla I). Es importante resaltar que, en general, las BAL enológicas

TABLA II

EFFECTO DEL JUGO GÁSTRICO SIMULADO SOBRE EL NÚMERO (log UFC/mL) DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) A DIFERENTE pH Y TIEMPO DE INCUBACIÓN

	Recuento bacteriano (log UFC/mL)				
	t ₀	t ₂₀	t ₄₀	t ₆₀	t ₉₀
	pH 5.0	pH 4.1	pH 3.0	pH 2.1	pH 1.8
<i>Cepas enológicas</i>					
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-16	8.54 ± 0.09	8.65 ± 0.07	8.29 ± 0.08	7.65 ± 0.07	5.34 ± 0.12
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-49	8.59 ± 0.05	8.55 ± 0.05	8.37 ± 0.19	7.95 ± 0.01	5.51 ± 0.06
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-85	8.60 ± 0.01	8.56 ± 0.13	8.60 ± 0.23	7.48 ± 0.01	5.80 ± 0.04
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-86	8.47 ± 0.05	8.38 ± 0.11	8.41 ± 0.04	7.95 ± 0.06	5.15 ± 0.21
<i>L. casei</i> CIAL-51	8.02 ± 0.06	8.10 ± 0.02	7.92 ± 0.13	7.27 ± 0.08	7.07 ± 0.10
<i>L. casei</i> CIAL-52	7.92 ± 0.13	7.86 ± 0.03	7.96 ± 0.17	7.34 ± 0.08	7.17 ± 0.24
<i>L. casei</i> CIAL-92	8.02 ± 0.11	7.96 ± 0.16	7.95 ± 0.15	7.70 ± 0.21	5.32 ± 0.01
<i>L. plantarum</i> CIAL-121	8.08 ± 0.07	8.06 ± 0.08	8.05 ± 0.13	6.20 ± 0.28	5.05 ± 0.38
<i>O. oeni</i> CIAL-117	8.82 ± 0.05	8.78 ± 0.01	8.84 ± 0.05	8.42 ± 0.04	5.04 ± 0.06
<i>O. oeni</i> CIAL-118	8.63 ± 0.01	8.62 ± 0.10	8.59 ± 0.05	8.40 ± 0.02	5.30 ± 0.14
<i>O. oeni</i> CIAL-119	8.59 ± 0.08	8.54 ± 0.02	8.46 ± 0.12	7.24 ± 0.29	4.89 ± 0.28
<i>Cepas de referencia</i>					
<i>L. plantarum</i> CLC 17	8.08 ± 0.07	8.19 ± 0.10	8.08 ± 0.11	7.95 ± 0.06	7.31 ± 0.12
<i>L. fermentum</i> CECT5716	8.59 ± 0.05	8.18 ± 0.01	8.18 ± 0.07	7.46 ± 0.15	6.74 ± 0.13

estudiadas mostraron porcentajes de crecimiento superiores a los observados en las cepas probióticas control, *L. plantarum* CLC 17 y *L. fermentum* CECT5716 (Tabla I). Esta buena tolerancia a la bilis está en consonancia con lo descrito por Delgado y cols. (19), Turchi y cols. (15), Jensen y cols. (17), y Chen y cols. (20) en otras cepas no enológicas de *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

Otro importante criterio de selección a considerar en la evaluación de un potencial microorganismo probiótico es analizar su capacidad para adherirse a la mucosa intestinal. En el presente trabajo, esta habilidad se analizó empleando la línea celular Caco-2, ampliamente utilizada en este tipo de ensayos ya que simula *in vitro* la diferenciación morfológica y funcional del epitelio del colon humano y muestra características de los enterocitos maduros (13). Los porcentajes de adhesión de las BAL enológicas a las células Caco-2 oscilaron entre 0.37-12.2 % dependiendo de la cepa, espe-

cie y género (Fig. 1). Esta dependencia está en línea con lo descrito previamente por Collado y cols. (21), cuyo rango de valores de adhesión osciló entre 0.9-20 % (*P. freudenreichii* JS y *L. rhamnosus* GG, respectivamente). La cepa *P. pentosaceus* CIAL-86 exhibió el porcentaje más elevado de adhesión (12.2 %), seguido por *L. plantarum* CIAL-121 (7.10 %), ambas con valores de adhesión superiores a las cepas probióticas de referencia (Fig. 1).

Finalmente, se evaluó la capacidad de las BAL del vino para prevenir la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal, llevándose a cabo para ello ensayos de inhibición de la adhesión de *E. coli* CIAL-153. Para estos ensayos, se seleccionaron las cepas *P. pentosaceus* CIAL-86 y *L. plantarum* CIAL-121, así como la cepa probiótica control *L. plantarum* CLC 17, evaluándose su capacidad para competir, inhibir y desplazar la unión de *E. coli* CIAL-153 a las células Caco-2 (Fig. 2). Partiendo de una adhesión de

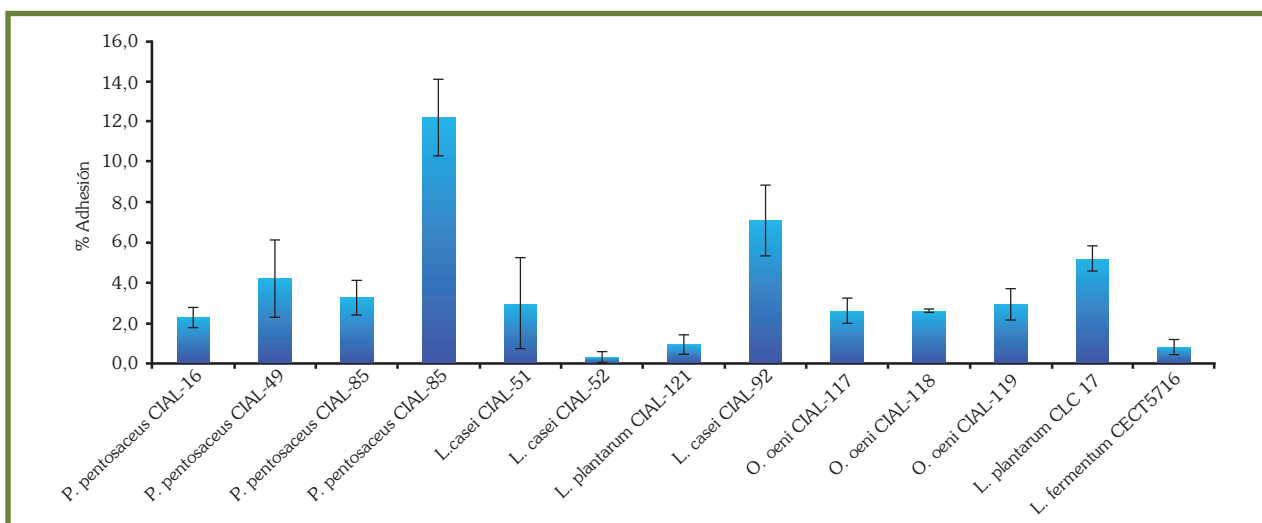


Fig. 1. Porcentaje de adhesión a células Caco-2 de las bacterias lácticas estudiadas.

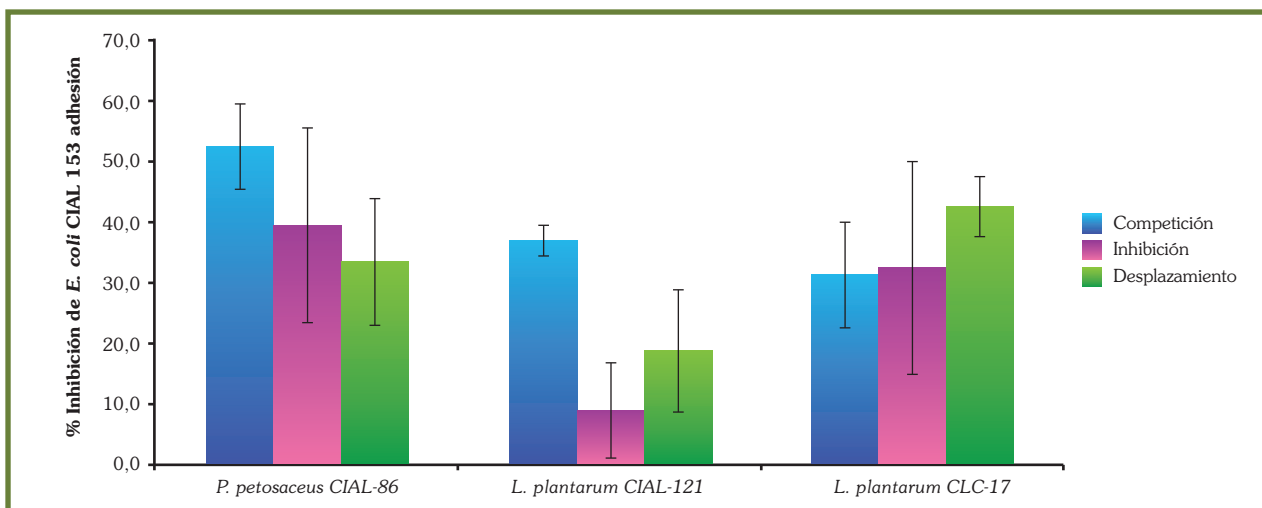


Fig. 2. Ensayo de anti-adhesión (competencia, inhibición y desplazamiento) de *E. coli* CIAL-153 en presencia de *L. plantarum* CLC 17, *P. pentosaceus* CIAL-86 y *L. plantarum* CIAL-121.

6.83 % de la cepa de *E. coli* CIAL-153 a las células Caco-2, su inoculación simultánea con las cepas de BAL enológicas estudiadas (ensayos de competición) redujo la capacidad de adhesión de *E. coli* CIAL-153 entre 31-52 % (Fig. 2); esta reducción está en consonancia con la descrita por Lee y cols. (22). En relación a la inhibición, en la literatura científica se ha descrito que dicha capacidad depende tanto del probiótico como del patógeno, lo que refleja su alta especificidad (21,23). En nuestro estudio, *P. pentosaceus* CIAL-86 fue la cepa que más inhibió la adhesión de *E. coli* CIAL-153 a las células intestinales, mientras que *L. plantarum* CIAL-92 fue la que mostró la menor inhibición (Fig. 2). Los altos valores de inhibición de *P. pentosaceus* CIAL-86 y *L. plantarum* CLC 17 (> 30 %) podrían indicar la competencia de estas cepas con *E. coli* CIAL-153 en su adhesión a receptores de membrana comunes (24,25). El desplazamiento de patógenos previamente adheridos también varió en función de la cepa y especie analizada (Fig. 2). Las diferencias obtenidas en los diferentes ensayos de anti-adhesión también han sido observadas por otros autores (21-23,26) y parecen confirmar que en cada uno de estos mecanismos están implicados diferentes procesos. Por otra parte, la ausencia de relación entre los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión y anti-adhesión sugiere que en ambos fenómenos estarían implicados diferentes factores y mecanismos, como ha sido descrito previamente por otros autores (21,26,27).

En resumen, los ensayos de adhesión y anti-adhesión reflejan una elevada especificidad de las cepas, destacando *P. pentosaceus* CIAL-86 por tener un excelente nivel de adhesión y una buena capacidad de anti-adhesión contra *E. coli* CIAL-153. A su vez, los resultados obtenidos muestran la buena resistencia de las once cepas de BAL enológicas seleccionadas a las condiciones hostiles del tracto GI, con valores de resistencia a la saliva, jugo pancreático y bilis similares o superiores a las observadas en las cepas probióticas control *L. plantarum* CLC 17 y *L. fermentum* CECT 5716. En conjunto, y en las condiciones *in vitro* ensayadas, estos resultados muestran, por primera vez, el potencial probiótico de las BAL del vino, si bien, son necesarios más estudios sobre su posible papel beneficioso para la salud humana.

CORRESPONDENCIA:

Almudena García Ruiz
 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)
 CSIC-Universidad Autónoma de Madrid
 C/ Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco
 28040 Madrid
 e-mail: almudena.garcia@csic.es

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos AGL2012-04172-C02-01, PRI-PIBAR-2011-1358 y Consolider Inge-

nio 2010 FUN-C-FOOD CSD2007-00063), la Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD P2009/AGR-1469) y el INIA (proyecto RM2011-00003-00-00). A. García Ruiz es beneficiaria de una beca del Instituto Danone●

BIBLIOGRAFÍA

1. Mohammadi R, Sohrabvandi S, Mortazavian AM. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Engineering in Life Sciences* 2012;12:399-409.
2. FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome; 2006.
3. Ohland CL, MacNaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010;298:G807-G819.
4. Jonganurakkun B, Wang Q, Xu SH, Tada Y, Minamida K, Yasokawa D, et al. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2008;106:69-73.
5. Kang H, Oh YJ, Ahn KS, Eom HJ, Han N, Kim YB, et al. *Leuconostoc citreum* HJ-P4 (KACC 91035) regulates immunoglobulin E in an ovalbumin-induced allergy model and induces interleukin-12 through nuclear factor-kappa B and p38/c-Jun N-terminal kinases signaling in macrophages. *Microbiology and Immunology* 2009;53:331-9.
6. Fernández de Palencia P, Werning ML, Sierra-Filardi E, Duenas MT, Irastorza A, Corbi AL, et al. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-b-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology* 2009;75:4887-91.
7. Folligné B, Dewulf J, Breton J, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Pot B. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology* 2010;140:136-45.
8. Moreno-Arribas MV, Polo MC. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology* 2008;25:875-81.
9. García-Ruiz A, Tabasco R, Requena T, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Bartolome B, et al. Genetic diversity of *Oenococcus oeni* isolated from wines treated with phenolic extracts as antimicrobial agents. *Food Microbiology* 2013;36:267-74.
10. Martin R, Olivares M, Marin ML, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez JM. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation* 2005;21:8-21.
11. Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suarez V, Vinderola G, et al. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* 2011;28:1033-40.
12. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 2003;36:895-904.
13. Fernández de Palencia P, Lopez P, Corbi AL, Pelaez C, Requena T. Probiotic strains: Survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology* 2008;227:1475-84.
14. Corzo G, Gilliland SE. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 1999;82:472-80.
15. Turchi, B, Mancini S, Fratini F, Pedonese F, Nuvoloni R, Bertelloni F, et al. Preliminary evaluation of probiotic potential

- of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2013;29:1913-22.
16. Bove P, Gallone A, Russo P, Capozzi V, Albenzio M, Spano G, et al. Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012;96:431-41.
 17. Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2012;153:216-22.
 18. Zavaglia AG, Kociubinski G, Perez P, De Antoni G. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *Journal of Food Protection* 1998;61:865-73.
 19. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B. In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology* 2008;104:1119-27.
 20. Chen LS, Ma Y, Maubois JL, Chen LJ, Liu QH, Guo JP. Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *International Journal of Dairy Technology* 2010;63:47-54.
 21. Collado MC, Jalonen L, Meriluoto J, Salminen S. Protection mechanism of probiotic combination against human pathogens: In vitro adhesion to human intestinal mucus. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 2006;15:570-5.
 22. Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52: 925-30.
 23. Gueimonde M, Jalonen L, He F, Hiramatsu M, Salminen S. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International* 2006;39:467-71.
 24. Lee YK, Puong KY. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition* 2002;88:S101-S108.
 25. Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2005;98:1303-15.
 26. Collado MC, Gueimonde M, Hernandez M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection* 2005;68:2672-8.
 27. Bibiloni R, Fernando P, De Antoni GL. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia. *Anaerobe* 1999;5:519-24.