

# Estado del arte en los aspectos científicos, tecnológicos nutricionales y de ingeniería de los agentes probióticos y prebióticos

<sup>1</sup>Mondragón B., Olga; <sup>2</sup>Maugeri, Francisco

<sup>1</sup>Especialización en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales.

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. E-mail:

[olgalumondragon@hotmail.com](mailto:olgalumondragon@hotmail.com)

<sup>2</sup>Faculdade de Engenharia de Alimentos FEA- Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

## Resumen

Alimentos que contienen pro y pre-bióticos se denominan simbióticos, estos benefician la salud manteniendo el balance de la flora intestinal, reduciendo la mala absorción de la lactosa, aumentando la protección contra infecciones intestinales, entre otros. Los probióticos y pre-bióticos son productos funcionales y nutraceuticos, los primeros se definen como "microorganismos vivos con capacidad de mejorar el equilibrio microbiano intestinal produciendo efectos benéficos para la salud del individuo" y los pre-bióticos son ingredientes alimenticios no digeribles y que selectivamente favorecen el crecimiento de bacterias benéficas. Los ingredientes alimentarios que cumplen con los requisitos de prebióticos, hasta el momento, son los oligosacáridos. Bacterias probióticas presentan sitios de acción diferente en el sistema digestivo (p.e. *Lactobacillus* actúan en el intestino delgado, mientras que bifidobacterias actúan en el intestino grueso). La reintroducción de estos grupos microbianos en el hospedero es hecha por medio de la administración de especies seleccionadas, que deberán estar en números elevados y viables en el momento de su consumo. Algunos aspectos técnicos son comunes en la producción de cualquier tipo de leche o bebida fermentada, como son: (i) tipo de organismos que constituyen el cultivo starter, (ii) temperatura, presencia de oxígeno y período de incubación, (iii) la proporción del inóculo, (iv) la producción del starter, y, (v) los factores de crecimiento.

**Palabras claves:** Pró-bióticos, Pré-bióticos, Simbióticos, Bifidobacterias, Lactobacilos, Oligosacáridos.

## Abstract

*Foods that contain pro and pre-biotic denominate symbiotic, these benefit the health maintaining the balance from the intestinal flora, reducing to the bad absorption of the lactose, increasing the protection against intestinal infections, among others. The probiotic and pre-biotic are functional products and nutraceutics, first they are defined as "alive micro organisms with capacity to improve the intestinal microbial balance producing beneficial effects for the health of the individual" and the pre-biotic are non digestible nutritional ingredients and that selectively favour the growth of beneficial bacteria. The nourishing ingredients that fulfil the requirements of pre biotic, until the moment, are the oligosaccharides ones. Pro biotic bacteria present/display sites of different action in the digestive system (*Lactobacillus* acts in the thin intestine, whereas bifid bacteria acts in the heavy intestine). The re-introduction of these microbial groups in the lodging is done by means of the administration of selected species, which will have to be in high and viable numbers at the moment of their consumption. Some technical aspects are common in the production of any type of milk or fermented drink, as they are: (i) type of organisms that constitute the culture to starter, (ii) temperature,*

*oxygen presence and period of incubation, (iii) the proportion of inoculo, (IV) the production of starter, and, (v) the growth factors.*

**Key words:** *Pre-biotic, pre-biotic, symbiotic, bifid bacteria, lacto bacillus, oligosaccharides.*

## **Introducción**

La dieta es un tema que hoy en día es el mayor foco estratégico en lo relacionado a salud pública, pues tiene por objetivo la manutención de una óptima salud a través de la vida, previniendo la aparición temprana de enfermedades crónicas como los desórdenes gastrointestinales, cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, así como, la procura de promotores de salud para la población de la tercera edad.

A pesar de las muy complejas relaciones entre alimentos y salud, que aún son poco comprendidas, recientes investigaciones en diversas áreas, muestran nuevos aprovechamientos que prometen mejorar la comprensión del tema como es el caso de la creciente demanda de alimentos 'saludables', que estimula la innovación y el desarrollo de nuevos productos en la industria de alimentos, nacional e internacionalmente.

Continuamente se incrementa el número de consumidores con conciencia de salud, en algunos casos por factores socio-económicos como la expansión europea y en otros por el interés mundial que se ha despertado por los alimentos funcionales.

Desde el tiempo de Metchnikoff (el primero que relacionó salud con el consumo regular de leches fermentadas, en el siglo XIX), se sabe que una flora intestinal balanceada es importante para la salud y bienestar del hombre (Tamine, 1995).

Recientemente se ha tenido un gran avance en el desarrollo de los productos llamados probióticos (productos que contienen microorganismos vivos capaces de beneficiar al hombre en algún aspecto, especialmente regulando la flora intestinal)

Trillones de bacterias de más de 400 especies diferentes, saprofitas y patógenas, viven armoniosamente en un delicado balance en el tracto gastrointestinal, hasta que este sea desequilibrado por la dieta, consumo de drogas, situaciones de estrés, tratamientos quimioterapéuticos, edad y otras situaciones, provocando diferentes tipos de problemas gastrointestinales como la Disbiosis Intestinal, definida como un desorden en el tracto gastrointestinal, debido al desequilibrio de las bacterias intestinales (Carvalho, 2001).

Se sabe que, en diferentes regiones del tracto intestinal, están presentes grupos específicos de microorganismos, como bacterias lácticas y bífidas, que modulan la microflora en estos espacios, principalmente debido a los productos de su metabolismo (Ferreira y Teshima, 2000).

Esa microflora deseable protege al hospedero antagonizando el crecimiento de microorganismos patógenos, además de mantener su salud, impidiendo la reabsorción de compuestos aminados indeseables, desconjugando ácidos biliares, biodisponibilizando minerales como calcio y hierro, efecto positivo en cáncer, disminución de enfermedades coronarias, ayuda digestiva, efectos nutricionales, estimulación inmune, actividad antitumoral, actividad antimutagénica.

(Ouweland, A., 1998), y, por medio de sus enzimas, favoreciendo el metabolismo de algunas sustancias como la lactosa, en individuos lactasa no persistentes (Salminen, 1999).

El intestino humano constituye un complejo ecosistema de microorganismos. La población bacteriana en el intestino delgado es muy alta y alcanza un recuento máximo de  $10^{12}$  UFC/g, en el intestino grueso el recuento de bacterias es de  $10^8$ - $10^{12}$ UFC/g, en el intestino delgado es considerablemente más bajo,  $10^4 - 10^8$  UFC/g ,  $10^6 - 10^7$  al final del íleon (Fooks, et al., 1999) mientras que en el estómago solamente se encuentran de  $10^1 - 10^2$  UFC/g, debido al bajo pH. Recuentos de  $10^{10} - 10^{11}$  UFC/g de Bifidobacterias es común en heces de bebés alimentados con leche materna, representando el 80 % de las bacterias intestinales (Gimenez, 2002). Bebés alimentados con biberón, normalmente tienen recuentos de 1-log menos de bifidobacterias ( $10^9 - 10^{10}$  UFC/g). en las muestras de heces que los bebés amamantados por la madre, y hay una tendencia para los bebés de biberón a tener niveles más altos de enterobacterias, estreptococos y otras bacterias putrefactivas.

### **Importancia de los probióticos**

Según Ferreira, et al. (2000), en las últimas décadas las enfermedades intestinales que provocan diarreas han aumentado, siendo la mayor causa de su origen el empleo creciente de antibióticos de última generación con amplio espectro de actuación.

Estos antibióticos, además de eliminar el agente biológico para el cual la droga es direccionada, eliminan también microorganismos benéficos, causando disturbios en la microbiota intestinal del hospedero. Como resultado, microorganismos como *Clostridium difficile*, resistentes a la mayoría de los antibióticos, aumentan en número, y sus toxinas son las responsables de la mayoría de diarreas. *Enterococcus* y *Escherichia coli* son otros grupos microbianos que causan problemas en pacientes hospitalizados, debido a la resistencia adquirida.

Algunos de los factores que afectan la composición de la microflora humana, enumerados por Fooks, et al. (1999), son: el tipo de alimentación, la cantidad, composición química y disponibilidad de sustancias de crecimiento, disponibilidad de sitios de colonización, interacciones inmunológicas, estrategias de fermentación individual por cada bacteria, el tiempo de tránsito intestinal, el pH intestinal, el potencial de oxidoreducción, disponibilidad de aceptores de electrones inorgánicos, producción de metabolitos bacterianos, presencia de compuestos antimicrobianos, edad del hospedero y movimientos peristálticos, entre otros.

Las principales especies que han sido empleadas para fines probióticos son bacterias del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*. Estirpes de *Enterococcus* spp. y *Bacillus* spp también han sido utilizados en la composición de algunos probióticos, además de *Bifidobacterium*. (Ferreira, et al. , 2000)

Para ser efectivos, los microorganismos probióticos deben ser rigurosamente seleccionados: I) origen humana, II) resistencia a los jugos gástricos, III) capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, IV)resistencia a la bilis, V) resistencia a la lisozima, VI)\*persistencia en el tracto intestinal humano VII)\*producción de sustancias antimicrobianas, VIII)\*Antagonistas de bacterias patogénicas y carcinogénicas, IX)\*seguros para uso clínico y alimenticio, X)el producto, en el momento de su consumo, deberá contener números elevados de microorganismos probióticos y, para esto, deberá resistir las condiciones de procesamiento (deshidratación, congelación, liofilización), XI)\*clínicamente validados y efectos sobre la salud documentados. (Fooks, et al., 1999 y \*Saarela, et al, 2000).

La Tabla 1 muestra bacterias lácticas que han sido usadas en preparaciones de probióticos solas o en combinación.

**Tabla 1.** Ejemplos de bacterias acidolácticas para consumo humano<sup>1</sup>. Probióticos<sup>4</sup>

Lactobacilli <sup>2</sup>	Bifidobacteria <sup>2</sup>	Streptococci	Enterococci
L. delbrueckii subsp Bulgaricus	Bif. Bifudum	S. thermophilus	Ent. faecalis
L. acidophilus	Bif. Longum		Ent. Faecium
L. rhamnosus	Bif. Breve		
L. salivarius	Bif. Infantis		Lactococcus lactis
L. johnsonii	Bif. Adolescentis <sup>3</sup>		
L. crispatus	Bif. Lactis <sup>3</sup>		
L. reuteri			
L. casei subsp. Casei <sup>3</sup>			
L. casei biovarShirota <sup>3</sup>			

<sup>1</sup>Tomado de Fooks, L. (1999),<sup>2</sup>Mc. Cartney, Wenzhi e Tannock (1996), <sup>3</sup>Tamine (1997).<sup>4</sup>Saxelin(1999)

En 1987, Mitsuoka propuso un esquema hipotético en el cual se ilustran las interacciones entre las bacterias intestinales y la salud humana, como se muestra en la Figura 1. Las bacterias intestinales fueron clasificadas en tres categorías: las llamadas maléficas, benéficas, y neutrales con respecto a la salud humana.

Una lista de los principales efectos benéficos terapéuticos atribuidos al consumo de probióticos, según Fuller (1989, Ibid, Lourens-Hattingh, et al. 2001) son:

### **Efectos benéficos**

- Manutención de la microflora intestinal normal
- Antagonista de crecimiento de patógenos
- Estimulación del sistema inmunológico
- Reducción de la intolerancia a la lactosa
- Reducción de los niveles de colesterol sereo
- Impiden la reabsorción de compuestos aminados indeseables
- Desconjugación de ácidos biliares
- Disminución de enfermedades coronarias
- Actividad antimutagénica
- Actividad anticarcinogénica
- Actividad antitumoral
- Mejora el valor nutricional de los alimentos

### **Efectos nutricionales**

- Aplicaciones terapéuticas
- Prevención de infección urogenital
- Alivia la constipación
- Protección contra diarrea de los viajeros
- Prevención de diarrea infantil
- Reducción de diarrea inducida por antibióticos
- Prevención de hipocolesterimia
- Prevención contra cáncer de colon e vejiga
- Prevención de la osteoporosis.
- Factores que afectan la viabilidad de los probióticos

La supervivencia de las bacterias probióticas en el medio de fermentación, depende de las cepas usadas, la interacción entre especies presentes, las condiciones de cultivo, la composición química del medio (p.e. fuente de carbono), acidez final, contenido de sólidos, promotores e inhibidores del crecimiento, concentración de azúcares (presión osmótica), oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), nivel de inoculación, temperatura de incubación, tiempo de fermentación y temperatura de almacenamiento (Lourens-Hattingh, et.al., 2000).

### **Factores de crecimiento**

Como argumenta Tamine, et al. (1995), los innumerables estudios de las bifidobacterias in vitro para lograr su desarrollo en leche y lograr altos números de células, han conducido a la descripción de muchos factores promotores de crecimiento, como el extracto de fracciones de metanol de células de *Propionibacterium freudenreichii* 7025 sobre *B. adolescentis*, o, ácidos grasos de cadena corta (formato, acetato, propionato y butirato) que también estimulan el crecimiento de bifidobacterias

Factor Bifidus 1: es un componente de la leche y el calostro, que consiste en glicoproteínas como N-acetilglucosamina. La k-caseína humana o sus derivados de tripsina son promotores de *B. bifidum*, la hidrólisis de la tripsina resulta en un glicomacropéptido que contiene azúcares como la glucosamina y galactosamina, los cuales tienen actividad de factor bífido. Un factor similar fue encontrado en el moco secretado por las glándulas salivares, el intestino delgado y el colon; contiene glicoproteínas con N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y ácido salicílico.

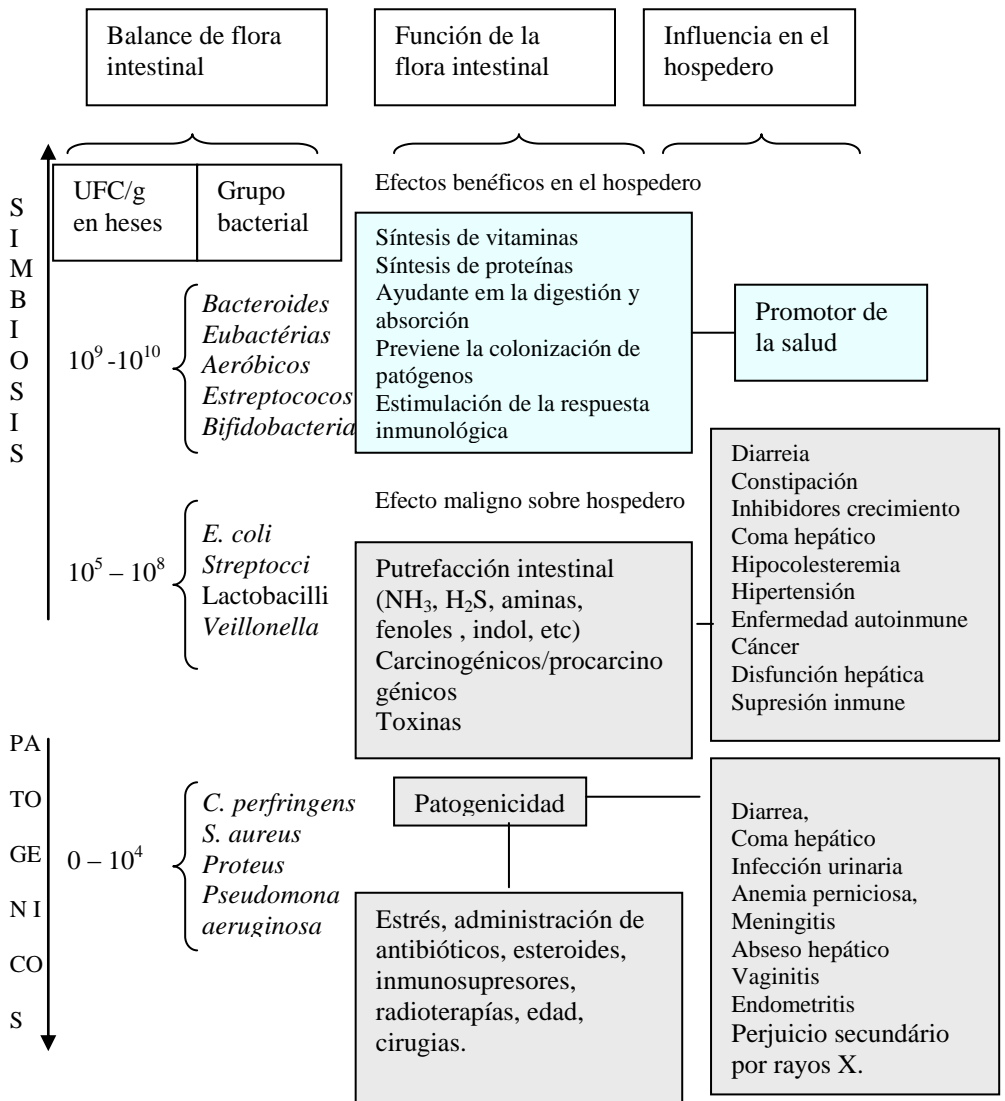
Factor Bifidus 2: La glicoproteínas de la leche y el suero parecen ser efectivas, y parecen ser péptidos no glicosilados de caseína, después de realizar hidrólisis con proteinasas.

Oligosacáridos: Han sido ampliamente estudiados por su habilidad promotora de crecimiento. La leche humana contiene una variedad compleja de oligosacáridos que pueden ser los responsables del crecimiento de *B. bifidum*, la especie predominante en las heces de bebés alimentados con leche materna.

La soya contiene oligosacáridos prebióticos como rafinosa y estaquiosa que son promotores naturales del crecimiento de bifidobacterias.(Tamine, et al.,1995).

### **Prebióticos**

“Un prebiótico es un ingrediente alimentario no digestible que afecta benéficamente al hospedero al estimular selectivamente el crecimiento y actividad de uno o más número limitado de bacterias en el colon, que pueden mejorar la salud del hospedero”, dicen Gibson & Roberfroid (1965 Ibid Fooks, et al. 1999, y Knorr, 1998).



**Figura 1.** Correlaciones entre bacterias intestinales y salud humana propuesto por Mitsouka (tomado de Laurens-Hattingh, *et al.* 2001).

### Características de los prebióticos

Conforme con lo descrito por Fooks, et al. (1999), el criterio para clasificación de los prebióticos como ingredientes alimentarios, incluye:

- ◆ No debe ser ni hidrolizado, ni adsorbido, en la parte superior del tracto gastrointestinal.

- ◆ Fermentación selectiva por bacterias potencialmente benéficas en el colon, es decir, debe promover selectivamente el crecimiento y/o estimular la actividad metabólica de bacterias promotoras de la salud y no la de otras bacterias.
- ◆ Alteración en la composición de la microflora del colon a favor de una composición más saludable.
- ◆ Preferiblemente, inducir efectos que sean benéficos para la salud del hospedero.

Hasta hoy, los ingredientes alimentarios que cumplen con los requisitos de los prebióticos son los oligosacáridos, tales como los frutoligosacáridos (FOS),  $\beta$ -D-fructanos, Gluco-oligosacáridos (GOS), Transgalacto-oligosacáridos (TOS), Iso-maltooligosacáridos (IMO) e inulina. (Fooks et al.,1999). Los oligosacáridos son azúcares de tres a diez unidades de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos  $\alpha(1-2)$  entre la fructosa terminal y la glucosa (Tamime et al. 1995), otros oligosacáridos presentes en algunos vegetales como las leguminosas son la rafinosa y estaquiosa que se caracterizan por ser indigeribles por el intestino humano y ser los causantes de algunos problemas digestivos como flatulencias (Scalabrini y otros, 1998). La síntesis de oligosacáridos es muy estudiada y existen patentes japonesas, brasileras y europeas. La inulina, es una macromolécula oligosacárida, para la cual las bifidobacterias han demostrado tener actividad de inulinasa.

Los FOS están formados por una molécula de sacarosa, con una, dos o tres unidades de fructosa unidas glicosídicamente mediante enlace  $\beta(1-2)$  a la molécula de sacarosa (Figura 2).

Estos oligosacáridos derivados de la sacarosa son encontrados naturalmente en vegetales y plantas como alcachofa, raíz de chicoria, dalia, diente de león, cebolla, ajo y banano. Sin embargo, las concentraciones presentes son bajas, exigiendo un consumo muy elevado para la obtención de los efectos fisiológicos deseados (Ferreira, et al. 2000).

Los FOS presentan propiedades físicas y fisiológicas que los tornan unos compuestos de gran potencial de aplicación en alimentos para nutrición humana y animal. Son azúcares no digeribles por el organismo humano, que pasan a través del intestino delgado sin ser absorbidos y van directo para el intestino grueso, donde son selectivamente utilizados por las bifidobacterias de la microflora intestinal (U.S. Pat.:5.314.810).

### **Producción de los Frutoligosacáridos (FOS)**

Según Maugeri & Pinheiro (2002), el procedimiento en medio acuoso es el siguiente:

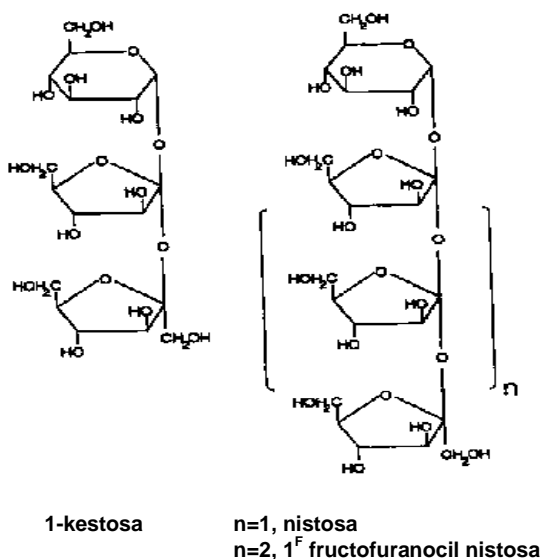
Producción de la Inulinasa: El microorganismo *Kluyverimyces* sp.- es inoculado en el medio de cultivo constituido por sacarosa, extracto de levadura, peptona y  $K_2HPO_4$ , con pH ajustado entre 3,0-4,0, e incubado a 30°C en un fermentador a 150 rpm por 72 h. La enzima extracelular es obtenida por centrifugación del caldo fermentado a 11.000 g durante 10 min a 4-6 °C.

Recuperación de la enzima con etanol: el sobrenadante obtenido se utiliza para recuperar la enzima. La precipitación de la enzima es realizada por la adición de lenta de etanol a -15 °C al sobrenadante, hasta alcanzar una saturación de 70 % de etanol. En seguida se centrifuga a 11.000 g por 15 min. a 4-6 °C. El sobrenadante es destilado para

la recuperación del etanol y el precipitado es resuspendido en tampón de fosfato de sodio 0,05 M a pH 5,0.

Purificación de la Inulinasa: La enzima recuperada en etanol se purifica por cromatografía iónica. La solución enzimática resuspendida en tampón es filtrada, la columna es previamente lavada con tampón fosfato 0,1 M a pH 6,0, temperatura entre 15-20 °C y seguido de un gradiente salino ascendente de 0-90%. El proceso es monitoreado a 280 nm. Durante la elusión de la enzima, se colectan las fracciones y se determina la actividad enzimática.

Inmovilización de la Inulinasa: puede ser realizada en diferentes medios como en carbón activado junto con alginato de sodio como agente gelificante, sílica y glutaraldehído o alginato de calcio. La mezcla se calienta hasta 80 °C, para que ocurra la disolución total del alginato. Luego se enfría a 40 °C, se adiciona 2% de la solución enzimática con una concentración de 50 UI/mL. Para la formación de las esferas, la solución es bombeada sobre una solución de Cloruro de Calcio 0,2 M en tampón de acetato 0,1 M bajo agitación.



**Figura 2.** Estructura química de frutoligosacáridos (Yun,1996)

Producción del Jarabe de azúcares conteniendo glucosa, fructosa y FOS a partir de sacarosa: Una columna encamisada es rellena con el biocatalizador, a una temperatura entre 35-50 °C. La columna se alimenta con una solución de sacarosa entre 40 y 70 % y pH de 5,0-6,5. La concentración de azúcares en la salida puede variar según las condiciones del proceso (concentración de alimentación, pH, temperatura, concentración del biocatalizador, actividad enzimática, tiempo de residencia en la columna). El producto obtenido es apropiado para la industria de alimentos, productos funcionales, prebióticos y ricos en fibra soluble alimentaria.

Actualmente se adelantan otros estudios para la obtención de rutoligosacáridos en medio orgánico (Alves, 2002).



## **Simbióticos**

Los productos que contienen una bacteria probiótica (Lactobacilo y/o Bacteria bífida) y un prebiótico son llamados simbióticos (Roberfroid, 1998 Ibid Saarela, et al., 2000).

En el desarrollo de simbióticos es necesaria la selección de variedades con mejor capacidad de utilización de un determinado prebiótico, para que se obtenga un efecto sinérgico en la implantación y proliferación de las bacterias deseables (Ferreira, et al, 2000).

Según Saarela, et al. (2000), como el concepto de simbióticos es nuevo no existen muchos estudios específicos de la interacción entre pro y prebióticos. En general, las propiedades de los prebióticos pueden influenciar el crecimiento y supervivencia de los probióticos, afectando a su vez el crecimiento tanto de probióticos como de cultivos starter en conjunto. Esto lleva a tomar en consideración las interacciones entre probióticos y starters. La interacción in vivo puede ser favorecida para una adaptación del probiótico al prebiótico, condicionando su metabolismo simultáneamente con un sustrato dado, resultando en una ventaja competitiva para el probiótico. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que probióticos pueden crecer sin este tipo de adaptación.

La simbiosis se presenta también entre microorganismos de diferentes especies o géneros como es el caso de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*: estos microorganismos mantienen una relación de simbiosis, en la cual el segundo produce ácido butírico y ácido láctico que acidifican el medio y el *L. casei* consume estos metabolitos, manteniendo el pH entre 6 y 7 compatible para la supervivencia de las especies inoculadas. (USPat.6,033,691).

## **Co-cultivos e interacción entre especies**

La supervivencia de *L. acidophilus* y especies de *Bifidobacterium* se ve afectada por las especies que participan en la fermentación, por causa de los metabolitos secretados por otros microorganismos. Dave y Shah (1997) reportaron que la inhibición de las bifidobacterias en yogurt no se debió a los ácidos orgánicos producidos o a la presencia de peróxido de hidrógeno, sino que se presume que la inhibición fue causada por los efectos antagonísticos entre los cultivos starter. Gilliland and Speck (1977, *ibid* Laurens-Hauttingh, et al., 2001), en estudios realizados mostraron que sustancias producidas por *L. bulgaricus* causaban el decrecimiento de *L. acidophilus* durante el almacenamiento en refrigeración de yogurt; el peróxido de hidrógeno producido durante la manufacturación es la principal sustancia causante de este antagonismo, comprobado por el hecho de que al adicionar catalasa se disminuyó el efecto, *L. acidophilus* y *B. bifidum* (Laurens-Hauttingh, et al., 2001) presentan un efecto sinérgico promotor de crecimiento, puesto que el segundo depende de otra bacteria ácido láctica para asegurar su crecimiento.

Unas 17 especies de bifidobacterias crecen en leche pura y 15 tienen problemas para sobrevivir, por el hecho de tener escasa actividad proteolítica, precisando para crecer de la adición de caseína proteolíticas como los Lactobacilos que algunos autores catalogan como una dramática pérdida de la viabilidad del *L. acidophilus*, adicionalmente la

sobreacidificación que causa *L. bulgaricus* durante el proceso y almacenamiento también afecta. Desde el punto de vista de Rybka & Kailasapathy (1995), la presencia de *L. bulgaricus* es el principal responsable de la mortalidad de *L. acidophilus* y de *Bifidobacterium* ssp.

Especies de *L. acidophilus* viven en excelente simbiosis con bifidobacterias pues son capaces de proveerles estimulantes de crecimiento. La mezcla de cepas vivas de *L. acidophilus* y especies de *Bifidobacterium* usada en producción de bio-bebidas recientemente, es conocida como AB-cultivos. La mezcla de AB cultivos con *S. thermophilus* produce los llamados productos fermentados ABT. (Vinderola, Reinheimer y otros, 2000).

### **Tecnología de Producción**

La tecnología y la bioquímica de las fermentaciones, incluyendo los cambios físico-químicos que pueden ocurrir en la leche durante la fabricación de yogurt y otros productos fermentados ha sido extensivamente investigada y revisada por muchos grupos de estudio. (Rasic & Kurmman, 1983, 1992 ; Tamine & Robinson, 1995, 2001, Dave & Shah, 1997, Vinderola & Reinheimer, 1999, 2000). Periódicamente, la International Dairy Federation publica monografías actualizadas de los aspectos científicos y tecnológicos en el campo de los lácteos y revisiones recientes de desarrollos tecnológicos para leches fermentadas, diseño higiénico de equipos de procesamiento de lácteos y mantenimiento de plantas de producción.

Sin embargo, los principales tópicos de producción de cualquier tipo de leche fermentada (p.e. estandarización del contenido de grasa, fortificación de los sólidos lácteos, homogenización, desaireación (opcional) y altos tratamientos térmicos) son comunes, así, aspectos técnicos que deben ser considerados en detalle, incluyen: los organismos que constituyen el cultivo starter, temperatura y período de incubación, la proporción del inóculo, y la producción del starter. El uso de equipos de desaireación de leche es altamente requerido para fermentación por bifidobacterias. La presencia de oxígeno en la leche puede prolongar el periodo de incubación.

### **Tecnología de los cultivos estárter**

El tradicional sistema de repiques (Banco de cultivo-madre-alimentador o intermediario-paquetes) para propagación de cultivos estárter en la manufacturación de leches fermentadas, comenzó a ser desplazado por el sistema DVS (Direc Vat Set) (Tamine, et al, 1995).

Los cultivos comerciales DVS son adquiridos en forma de liofilizado concentrado o como cultivos concentrados mantenidos en congelación a  $-196^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente almacenarlos entre  $-40$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , este tipo de cultivo puede ser conservado a temperaturas menores a  $5^{\circ}\text{C}$  hasta  $-20^{\circ}\text{C}$ , entre mas baja la temperatura, mayor será la extensión de la vida útil. La actividad de los cultivos depende de la tasa de supervivencia, el recuento en promedio es mayor o igual a  $10^{11}$  UFC/g. Para lograr altos recuentos, las células bacterianas son concentradas antes de la preservación y almacenamiento. Los cultivos de bacterias probióticas altamente concentrados son

usados como adjuntos dietarios para consumo directo, por ejemplo como tabletas farmacéuticas.

Existen diferentes métodos para ser usados en la concentración de biomasa de bacterias ácido lácticas, en el caso de bifidobacterias se utiliza la técnica de separadores mecánicos (tipo Sharples), neutralización del medio de crecimiento hasta pH 6,0 usando  $\text{NH}_4\text{OH}$  10M o  $\text{NaOH}$  2M y ultrafiltración (UF) o microfiltración. Los cultivos pueden ser exitosamente conservados por liofilización o congelamiento a temperaturas bajas desde  $-10$  a  $-196$  °C. El congelamiento y/o el secado pueden causar daños en las células bacterianas, pero el uso de compuestos criogénicos (como leche descremada estéril, sacarosa, lactosa, gelatina, pectina, caseinato de sodio, alginato de sodio, glicerol y sorbitol) han ayudado a mantener la actividad de bifidobacterias. Factores como el recuento microbiano inicial antes de la conservación, el contenido de humedad en el cultivo liofilizado, el uso de compuestos de protección, el empaque bajo atmósferas controladas de  $\text{N}_2$ , el uso de empaques impermeables al oxígeno y la temperatura de almacenamiento, influyen en la tasa de supervivencia de los probióticos. Estudios de algunos autores encontraron que la mejor tasa de supervivencia para especies de bifidobacteria se consiguió con la concentración por membrana de los cultivos y la adición de leche descremada (100 g/L) y sacarosa (120 g/L) como material criogénico.

Otros estudios encontraron que un medio con base de suero de bajo costo, fue efectivo para el crecimiento de *B. bifidum* en un proceso continuo de un reactor acoplado a una unidad de UF. Se obtuvo una buena viabilidad para los cultivos almacenados a  $-4$ ,  $-20$  y  $-80$  °C, así como para los liofilizados.

### **Preparación del inóculo**

En la patente USPat. 6,033,691, sugieren la preparación del inóculo de los microorganismos de la siguiente forma: Las cepas de *Lactobacillus* ssp y *Bifidobacterium* ssp son cultivadas en un medio con base de leche (o con el medio en que se requiera adaptar), previamente esterilizado, por ejemplo, a 90 °C por 5-6 minutos.

El producto esterilizado, es enfriado a 37 °C y adicionado de oligoelementos como hierro, cobalto y molibdeno, y de aditivos como biotina y aminoácidos, ajustando el pH entre 6,50 y 7,75. Las cepas de los lactobacilos son suspendidas en una solución fisiológica estéril e inoculadas. La incubación se realiza a 37 °C durante el período regulado por el recuento de la flora viable, usualmente entre  $10^5$  y  $10^9$  UFC/mL. Durante el período de incubación es importante mantener el pH entre 6,30 y 6,60 a través del uso de soluciones tampón o ácidos y bases biocompatibles.

### **Tamaño del inóculo**

Varios autores comentan acerca de cuanto debe ser el tamaño del inóculo, a continuación se enumeran algunos de las recomendaciones más usadas en el asunto en cuestión:

Los cultivos liofilizados de probióticos se aplican por medio de la técnica DVS (Direct Vat Set), es decir, directamente del paquete al medio de fermentación (Saarela, 2000).

Rasic & Kurmam (1983), comentan que los paquete con microorganismos probióticos liofilizados que se comercializan actualmente son altamente concentrados. Los cultivos

concentrados deben contener mínimo  $5 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$ , los no concentrados contienen hasta un máximo de  $1 \times 10^8$  UFC  $g^{-1}$

Varman (1994) aconseja usar un alto nivel de inóculo, de 10-20%, mientras que Dave & Shah (1997), dicen que el incremento del nivel de inóculo no mejora la viabilidad de los probióticos.

Hansen (1985), basado en sus estudios recomienda usar 700-800 millones ( $7-8 \times 10^8$ ) de *L. acidophilus* /mL y 400-500 millones de *B. bifidum*/mL. Inóculos menores a  $10^4:10^3$  (*B. bifidum*: *L. acidophilus*) suprimen el crecimiento.

## Reglamentación para productos con probióticos

Rybka & Kailasapathy (1995), estipula un número  $> 10^7$  UFC/mL para alcanzar un efecto terapéutico óptimo. Una persona puede llegar a consumir  $10^8$  células de probióticos por día, el consumo regular de 400-500 g/semana de la bebida fermentada, conteniendo  $10^6$  células viables por mililitro, puede suministrar ese número. El criterio de la NYA (Nacional Yogurt Association de los Estados Unidos) es de  $10^8$  UFC/g de bacteria ácido láctico en el tiempo de la manufactura y después del embalaje. El reglamento de la Australian Food Standars Code, dice que los productos fermentados requieren pH de 4.5 o menor para prevenir el crecimiento de contaminantes patogénicos. (Lourens-Hattingh, 2001). Para que la bebida fermentada sea considerada un producto probiótico es necesario que las bacterias probióticas sobrevivan en el producto durante su vida de estantería. (Saxelin, et al., 1999). En el Japón se estableció una cantidad de oligosacáridos que suplemente el requerimiento de 0,8 g/kg de peso corporal por día (Yun, 1996).

## Productos del mercado mundial con probióticos y prebióticos

Desde la década pasada se ha presentado en Europa, Norteamérica y en muchos otros países un alto incremento en marcas de productos lácteos (fermentados o dulces) que contienen Bifidobacterias originarias de humanos. Cada producto fermentado es hecho usando un solo género, o en combinación con otras bacterias lácticas en forma de mixturas de cultivos estérter como se muestra en algunos ejemplos mas adelante (Tamine, A., Marshall, V. Robinson, R., 1995)

En las patentes de productos relacionados con probióticos y prebióticos, se reportan bebidas con leche de vaca u otros orígenes, productos deshidratados para uso farmacéutico o alimentación animal, así como combinaciones de probióticos para adición en diferentes tipos de alimentos de origen vegetal o animal (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resumen de algunas patentes de productos relacionados con probióticos y prebióticos.

Número	Título	Fecha de publicación	Resumen	Fuente
EP1186295 A1	Préparations pharmaceutiques contenant des extraits d'isoflavone de soya et des microorganismes probiotiques.	2002-03-13	Preparación farmacéutica de extractos de isoflavonas de la soya y los microorganismos probióticos vivos, como producto de la combinación, para un suministro simultáneo o separado en el tiempo, útil en el tratamiento de los síntomas ligados a la menopausia.	esp@cenet

FR2789854	Ice Cream producer based on fermented soyamilk or other vegetable	2000-08-25	Helado hecho con leche vegetal fermentada, especialmente la leche de soya y jarabe de cereal rico en glucosa. Preparación: (a) preparación de leche vegetal; (b) inoculación de la leche con bacteria láctica, preferiblemente probiótica; (c) recuperación del coagulado; (d) adición del jarabe de cereal rico en glucosa; (e) homogeneización de la mezcla; (f) formación del helado.	esp@cenet
FR2668683	Nutritional food supplement for force-fed palmipeds	1992-05-07	Consiste en harina de soya o arveja mezclada con bicarbonato de sodio, probióticos, vitaminas, minerales, enzimas, suero y aminoácidos y llevado en forma de ovoides masticables. El producto de acuerdo con la invención sirve como alimento fortificador de palmípedos para producción de paté.	esp@cenet
6,254,900	Method for the manufacture of cheese, quark and yogurt products from soybeans	2001-07-03	Incluye los siguientes pasos: (a) preparación de la leche de soya; (b) adición de azúcar vegetal; (c) adición de grasas y aceites vegetales emulsificantes en la leche de soya; (d) preparación del cocktail de cultivo con pH de 3.8-4.5... (e) maduración final del producto hasta obtener queso, quark y yogurt.	USPatens
6,033,691	Process for manufacturing a biologically active fermented milk product and product obtained by the process	2000-03-07	Lactobacillus Casei (ATCC 55544) e Lactobacillus Acidophilus (ATCC 55543) são simultáneamente inoculados en leche previamente adicionada con Streptococcus, y después fermentado, resultando un producto de leche activo biológicamente. El producto puede ser mantenido entre 4-10 C por 30 días. El producto puede ser liofilizado y mantenido a 20-25 °C, U.R. 40-60% por mínimo 4 meses. Al reconstituirse consigue un pH cerca del líquido y es palatable.	USPatens
5,895,648	Composition for feef use comprising lyophilized live lactic bacteria	1999-04-20	Compuesto de uso alimentario que contiene una mezcla de bacterias vivas liofilizadas comprendiendo por lo menos dos especies de bacterias seleccionadas de Bifidobacterium brevi, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum y Bifidobacterium bifidum y por lo menos dos especies de bacterias seleccionadas de Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, lactobacillus plantarum e Streptococcus faecium y uno o más oligosacáridos.	USPatens

5,922,375	Probiotic Bifidobacterium strain	1999-07-13	Especie de Bifidobacterium aislado incorporado en alimentos, bebidas, alimentos para animales e o suplementos alimenticios.	USPatens
-----------	----------------------------------	------------	---	----------

Las leches fermentadas son definidas como el producto de leche fermentada por la acción de microorganismos específicos, resultando en una reducción del pH y coagulación. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes (no menor que  $10^7$  UFC/g) en el producto en la fecha de mínima durabilidad (Ouwehand,A., 1998, Kurman,1992), pero no todos son probióticos.

Muchos productos contienen Bifidobacterias, *B. bifidum* y *B. longum* son altamente empleados como mezclas de cultivos estándar en combinación con *L. acidophilus* y cultivos de yogurt (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y/o *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). En algunos casos *Lactococcus* ssp. y *Pediococcus acidilactici* también son usados. Alimentos y bebidas como Yakult® (Japón), Biogurt® (Alemania), Biokys® (Rep. Checa), Mil-Mil® (Japón), AKTIFIT plus® (Suiza), Ofilus® (Francia), Philus (Suecia), BA live (Inglaterra), A – 38 (Dinamarca), Zabadi (Egipto) entre otros contienen probióticos (*Lactobacillus* ssp e *Bifidobacterium* ssp) y se comercializan en el mundo.

### **Futuros Desarrollos e Investigaciones**

La investigación en el campo de los probióticos y prebióticos todavía tiene muchas posibilidades de estudios, dirigidos a su mejor conocimiento, incremento de su supervivencia en diferentes medios o condiciones de proceso, facilitar su acceso en diferentes mercados, facilitar su manipulación en la manufactura de productos y lograr efectos positivos en nutrición-salud humana cada vez mayores. Varios autores como Salminen et al. (1999), Tamine et.al.(1995), Saarela et al. (2000), entre otros coinciden en que las futuras investigaciones en el campo de los probióticos son:

La interconexión entre los conocimientos de expertos y científicos en alimentos, con el funcionamiento del tracto gastrointestinal y la salud humana.

Estudiar los mecanismos de acción de los probióticos en el tracto gastro-intestinal, y el desarrollo de herramientas de diagnóstico y biomercadeo.

La evaluación del papel de los probióticos en la salud de grupos de consumidores.

Direccionar aspectos específicos relacionados con los consumidores y la comercialización de productos funcionales.

Asegurar la estabilidad y viabilidad de productos probióticos por tecnologías de punta (p.e. bioencapsulación).

Desarrollar tecnologías para aplicaciones de probióticos en productos no lácteos. Selección de especies susceptibles y con capacidad de fermentación de leche y otros sustratos.

Manipulación genética, si fuera posible, para mejorar el crecimiento en leches de las bifidobacterias y reducir la alta producción de ácido acético.

Debido a que los resultados in vitro no siempre se han relacionado con las pruebas in vivo, o los resultados con experimentos en animales no siempre son aplicables en humanos, se sugiere implementar diseños experimentales que envuelvan pruebas con humanos voluntarios.

Mayor intervención del área médica en estudios sobre los efectos benéficos de microorganismos terapéuticos.

Desarrollo de cultivos estériles que no dependan de otros y que inhiban el crecimiento de microorganismos indeseables.

Necesidad de más metodologías para desarrollar la caracterización de la microflora intestinal, incluyendo especies no cultivables.

Importancia de la viabilidad

Fenómenos de comportamiento de probióticos en combinación o no con otras especies o con sustancias promotoras de crecimiento como los prebióticos, para lograr efectos simbióticos.

La bioingeniería y biotecnología de producción: estudios de cinéticas y determinación de parámetros cinéticos que permitan mejoras en las aplicaciones tecnológicas.

Ampliar los estudios relacionados con prebióticos, especialmente en la obtención de fructooligosacáridos, en la obtención de mayores rendimientos de producción, hallazgo de nuevas especies o fuentes de enzimas para síntesis.

Así como su efecto sobre los diferentes probióticos, preparaciones simbióticas y efectos sobre la salud.

## **Conclusiones**

Actualmente existe la necesidad de ofrecer al mercado nuevos productos funcionales y nutracéuticos, que complementen algunos requerimientos nutricionales y que aporten los beneficios que presentan los probióticos y prebióticos en el mantenimiento del balance de la microflora intestinal, la reducción de problemas intestinales como la mala absorción de la lactosa o la protección contra infecciones y la prevención de algunas enfermedades relacionadas con la digestión.





La integración de grupos multidisciplinarios para la investigación y desarrollo de productos funcionales y nutracéuticos que involucren probióticos y prebióticos se hace indispensable hoy en día, pues existe una conciencia mayor por parte de la población para el consumo de alimentos más saludables y nutritivos; también, para contribuir con el objetivo general de promoción de la salud, disminución de la desnutrición y malnutrición humana, y el ofrecimiento de alternativas alimenticias para la población con necesidades específicas de nutrición.

## Bibliografía

- 📖 Alves, F.V. Síntese de Oligossacarídeos por inulinase em meio orgânico. Campinas, 2002. Tese de Doutorado (em andamento) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 📖 Applicant No. 195006. Hansen; Wilhem.(1998). Method for the manufacture of cheese, quark and yogurt products from soybeans. USPatens 6,254,900, 18 nov. 1998, 3 jul 2001.
- 📖 Carvalho, Gabriel. Nutrição, probióticos e Disbiose. Nutrição, Saúde & performance, ano 3, n.14, p. 36-37, 2001
- 📖 Dave, R.I., & SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. Journal of Dairy Science. v. 81, p. 2804-2816. 1997
- 📖 Ferreira, Célia L.L., TESHIMA, Elisa. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. ano III –n. 16 – set./out. p. 22-25, 2000.
- 📖 Fooks, L. J.; Fuller, R.; Gibson, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. International Dairy journal. v.9, p.53-61, 1999.
- 📖 Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. Journal or applied Bacteriology. v. 66, p. 365-378,1989. Ibid: International dairy journal. v. 11, p. 1-17, 2001.
- 📖 GIBSON, G. R. and Roberfroid, M.B. Dietary and modulation of human Colonic Microbiota: Introducing the concept of Prebiotics. J. Nutr. v. 125, p.1401-1412, 1995. Ibid Trends in Food Science & Technology. v. 9, p. 295-306, 1998
- 📖 Gimenez P., Mariana Alessandra. Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós-acidificação de iogures. Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 86 p.
- 📖 Guillilan, S.E. & Speak, M. L. Antagonistic action of *L. acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. Journal of food protection. v. 40(11) p.820-823, 1977.
- 📖 HANSEN, R. Bifidobacteria have come to stay. North European Dairy Journal. v. 3. p. 1-6. 1985.
- 📖 Hansen; W. Method for the manufacture of cheese, quark and yogurt products from soybeans. APPLICANT No. 195006. USPatens 6,254,900, 18 nov. 1998, 3 jul 2001.
- 📖 Knorr, Dietrich. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. Trends in Food Science & Technology. v. 9, p. 295-306, 1998
- 📖 Kurman, Joseph A., Rasic, Jeremija. Encyclopedia of fermented fresh milk products. New York: Van Nostrand Reinhold., 1992. p.306-307
- 📖 Laboratoires dolisos, Pierre Fabre; René Belle; Bernard Fabre. (2002). Préparations pharmaceutiques contenant des extraits d'isoflavone de soya et des microorganismos probióticos. FR. n. EP1186295A1. 31 ago 2001, 13 mar 2002. Office européen des brevets. esp@cenet database
- 📖 Le Soyami Soc (FR). Garreau Jean. James. Ice Cream product based on fermented soymilk or other vegetable. FR 2789854, 25 ago 2000. esp@cenet database
- 📖 Lourens-Hattingh, A.; Viljoen, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. International dairy journal. v. 11, p. 1-17, 2001.
- 📖 Mc. Cartney, Wenzhi and Tannock. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of human. Applied and environmental



- Microbiology,62,4608-4613, 1996. Ibid: International dairy journal. v. 9, p. 53-61, 1999.
- 📖 Ouwehand, Arthur, Salminen J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*. v. 8, p. 749-758, 1998
- 📖 Pinheiro, Andreina S. Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Campinas, 2002. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
- 📖 Ponconnet Eric, Eric Ponconnet. Nutricional food supplement for force-fed palmipeds. FR 2668683. 7 mayo 1992. esp@cenet database .
- 📖 RASIC, J.L. Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *IDF bulletin*, v. 252, p. 22-48, 1990. Ibid *International dairy journal*. v. 11, p. 1-17, 2001.
- 📖 Ribka, S. & Kailasapathy, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*. v. 50(2), p. 51-57, 1995.
- 📖 Roberfroid, M. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am.J Clin Nutr* 71(suppl):1682S-7S.
- 📖 Saarela, M; Mogensen, G.; Fondén, R.; Mättö, J.; Mattila-Sandholm, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. v. 84, p. 197-215, 2000.
- 📖 Salminen, S., Ouwehand, A. Probiotics: how should they be defined?. *Food science & technology*. v.10, p. 107-110, 1999.
- 📖 SANCOR Cooperativas Unidas Limitada. Ricardo Alberto Cravero. Process for manufacturing a biologically active fermented milk product and product obtained by the process. US Patents 6,033,691, 17 sept. 1998, 7 mar. 2000.
- 📖 Saxelin, M. (1999). The technology of probiotics. *Food science and technology* 10, 387-392, 1999.
- 📖 Scalabrini, P., Rossi, M., Spettoli, P., & Matteuzzi, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. v. 39. p. 213-219.1998
- 📖 Sitia-Yomo S.p.A. Cavaliere Vesely; Renata; Giani; Giovanni; Maiocchi; Gianluigi, Vesely; Marco Emilio; Leonardo. Composition for feed use comprising lyophilized live lactic bacteria. US Patents 5,895,648, 3 sept. 1997, 20 abr. 1999.
- 📖 Tamine, A., Marshall, V. Robinson, R. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*. v. 62 p. 151-187, 1995.
- 📖 Tamine Y. & Robinson, R. *Yogurt science and technology*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. Second edition. 2001. p.358-359,366-367.
- 📖 Tamine, Y. & Robinson, R. *Yogurt ciencia y tecnología*. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. 1991.368 p.
- 📖 Universidade Estadual De Campinas. Francisco Maugeri Filho; Andreina Maria Pinheiro Santos. Produção de xarope de açúcar contendo frutose e glicose, enriquecido ou não com frutooligossacarídeos, a partir de sacarose. BR. Pedido de patente PI0202602-3, 28 fev 2002.
- 📖 Varman, A. H. & Sutherland, J. P. *Milk and milk products*. London: Capman and Hall. 1994. p 347-380.

-  Vindelora, C. G.; Reinheimer, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*. v. 10, p. 271-275, 2000.
-  Vindelora, C. G.; Reinheimer, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*. v. 9, p. 497-505, 1999.
-  Wisconsin Alumni Research Foundation. John B. Luchansky. Probiotic *Bifidobacterium* strain. USPatens 5,922,375, 25 nov. 1998, 13 jul. 1999.
-  Yun, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and application. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 19, p. 107-117, 1996.