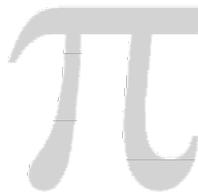




**REFLEXIÓN Y REVISIÓN
DE TEMAS DE
INGENIERÍA**



Universidad Nacional
Abierta y a Distancia



REVIEW: BACTERIAS LÁCTICAS: FUNCIONALIDAD, POLISACÁRIDOS, POTENCIAL TERAPÉUTICO Y APLICACIONES EN ALIMENTOS

LOCTICACID BACTERIA: FUNCTIONALITY, POLYSACCHARIDES, THERAPEUTIC POTENCIAL AND APPLICATIONS IN FOOD

Olga Lucía Mondragón-Bernal¹, Francisco Maugeri Filho²

Resumen

Esta revisión bibliográfica muestra los adelantos recientes en relación con las bacterias lácticas, su potencial funcional y terapéutico, en la síntesis de polisacáridos y sus posibilidades de aplicación en la industria de cultivos *starter*, alimentos y alimentos-saludables. Se abarcan tópicos, tales como, el origen de las bacterias lácticas (BAL), aplicaciones artesanales e industriales, sus características biológicas y genéticas, descripción de un número diverso de especies, los principales productos de fermentación, con un enfoque mayor en la obtención de exopolisacáridos para aplicación en la industria de alimentos, así como conceptos y avances en alimentos funcionales como los simbióticos, incluyendo las perspectivas futuras de investigación.

Palabras clave: bacterias lácticas, fermentación de alimentos, exopolisacáridos, alimentos simbióticos.

Abstract

This review shows the recent acid lactic bacteria advances, their functional and therapeutic potential, synthesis of polysaccharides and their possibilities of application in the cultures of starter industry, foods and healthful-foods. There are included topics that go from the origin of the lactic acid bacteria (LAB), tipic and industrial products applications, their biological and genetic characteristics, description of a diverse number of strains, their main products of fermentation, with a greater approach in the exo-polisaccharides producing for the application in the food industry, as well as concepts and advances in functional food like the symbiotic ones, until the future perspective of researchs.

Key words: lactic acid bacteria, synbiotic food, food fermentation, exopolisaccharides.

Recibido: febrero de 2008

Aprobado: junio de 2008

1 Olga Lucía Mondragón, MSc en Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Brasil. E mail: olgalumondragon@hotmail.com

2 Francisco Maugeri Filho. DSc. Laboratorio de Engenharia, Facultad de Engenharia de Alimentos FEA, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Brasil. E mail: maugeri@fea.unicamp.br

Introducción

Una de las formas más antiguas de conservación de los alimentos es la fermentación láctica. Las bacterias lácticas (BAL) han sido estudiadas por siglos para la producción de alimentos fermentados, dada su actividad metabólica, proporcionando preservación y *flavor*. Un número creciente de especies intrínsecamente seguras, son usadas intencionadamente como cultivos *starter* en la industria biotecnológica para producir alimentos más estables, sensorialmente más deseables, con mayor valor comercial y calidad higiénica [54]. Las BAL son originarias de la antigua y tradicional fermentación artesanal de alimentos. La fermentación láctica está directamente relacionada con la industria tradicional de leches fermentadas, con la industria de procesos fermentativos, así como con la industria de cultivos *starter*; por tanto, las bacterias lácticas (BAL) son ampliamente empleadas [93]. También en productos como carnes maduradas, embutidos, panes con levadura de cerveza, té, shoyu (salsa de soya), sidra, cerveza y vino (fermentación maloláctica) están presentes [79].

Las BAL y/o los cultivos *starter* cumplen varias funciones en los alimentos, entre estas, la seguridad higiénica a través de la acidificación del producto, también la estabilidad durante el almacenamiento y propiedades sensoriales atractivas [93]. El atributo más importante de las BAL es la producción de ácido láctico, que disminuye el pH y ejerce efecto inhibitorio en microorganismos esporulados. En las últimas décadas, los principales esfuerzos en las investigaciones están relacionados con la fisiología y genética en referencia con las BAL. Ellas poseen un potencial metabólico diverso, específico para cada especie, que varía desde la formación de compuestos precursores del sabor, hasta la excreción de compuestos antimicrobianos, incluyendo bacteriosinas, capaces de inhibir algunos patógenos causantes de enfermedades alimenticias y microorganismos esporulados [54].

La fermentación láctica se presenta como la conversión de los azúcares del medio para ácido láctico a través de la actividad específica de diversas BAL. La formación de ácido láctico sirve para acidificar el producto, conservarlo y conferirle sabor. Cuando el pH se aproxima a 4, el desarrollo de bacterias indeseables es impedido por la concentración de ácidos orgánicos, principalmente, el ácido láctico [3, 79]. Otros ácidos grasos de cadena corta como el acético y el butírico también son producidos por algunas especies de BAL [48, 46, 45]: esto permite que los productos se conserven por un tiempo más prolongado. La actividad bioquímica de las BAL también cumple otras funciones como: hidrolizar proteínas, alterando la textura del producto [3] y haciéndolas más digeribles [62]; desarrollar propiedades organolépticas de los alimentos fermentados, por medio de la producción de un gran número de enzimas glicolíticas, lipolíticas y proteolíticas; modificar la estructura y el aroma de los alimentos fermentados y contribuir para el desarrollo de sus características gastronómicas y sensoriales. Las BAL transforman los nutrientes fundamentales de los productos alimenticios en compuestos con propiedades sensoriales complejas [79].

Las bacterias lácticas son cocos o bacilos gram positivos, que poseen un porcentaje menor a 54 de G+C en su genoma, razón por la cual existe gran controversia en relación con el género *Bifidobacterium* pues posee un porcentaje mayor a 55% de G+C en el genoma.

Dentro de estas características, se encuentran cinco géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* [79].

[93] explica que varias especies de BAL fueron detectadas e identificadas con métodos moleculares, siendo estos métodos alternativas poderosas para la diferenciación tradicional de bacterias. Lo anterior es importante para el control de calidad de los productos fermentados, identificación de especies con aplicaciones terapéuticas o productoras de polisacáridos y otras características funcionales.

La capacidad de las bacterias lácticas (BAL) para producir exopoli- y oligosacáridos fue y es sujeto de extensos esfuerzos de investigación, dadas sus propiedades fisicoquímicas y potencial promotor de salud. En los últimos años, muchas BAL de grado alimenticio han sido seleccionadas por la anterior habilidad: también algunas glicosiltransferasas involucradas en su biosíntesis han sido caracterizadas a nivel bioquímico y genético, pudiendo ser usadas en alimentos y otras industrias relacionadas, así como en la aplicación adicional en el área médica [54].

Exopolisacáridos – EPS -

Los polisacáridos son un grupo de polímeros altamente diverso, cuyas características funcionales individuales son determinadas por características estructurales de muy variadas masas moleculares, tipos de enlaces glucosídicos, grados de ramificación y composición química. Como resultado de una sin igual variedad de posibles enlaces químicos, que contienen un cierto número de biomoléculas, los polisacáridos son la más versátil porción de componentes de la demanda vital de células para el almacenamiento de componentes, formación de estructuras y reconocimiento celular. Al mismo tiempo, esta diversidad ofrece una extensa aplicación de estos polímeros en la industria, cubriendo desde la aplicación masiva de los simples componentes hasta su explotación, como promotores de salud y aun como compuestos farmacéuticos [52, 54].

Los polisacáridos pueden ser divididos en estructurales y no estructurales. Los estructurales (o constructivos) son parte del material que forma la estructura de plantas, insectos o bacterias (por ejemplo, celulosa, pectina, quitina y murina). Los polisacáridos no estructurales (por ejemplo almidón, glicógeno e inulina) generalmente sirven como reserva energética en eucariotas. Estos polisacáridos pueden ser sintetizados no solamente por plantas y algas, sino también por una amplia variedad de microorganismos incluyendo mohos, levaduras y bacterias, dentro de los cuales su papel no siempre es claro. Basados en su localización, los polisacáridos microbianos pueden ser divididos en: polisacáridos encapsulados (PSC) asociados con la superficie celular, los cuales se supone que existen para mejorar las características virulentas de patógenos como el *Streptococcus pneumoniae* y polisacáridos extracelulares (EPS), secretados dentro del medio ambiente [54].

Basándose en su composición, los EPSs pueden ser clasificados en homo (HoPSs) y heteropolisacáridos (HePSs). Los HoPSs consisten de un monosacárido (la mayoría fructose o glucose) y son usualmente producidos en grandes cantidades por encima de 40 g/L de sucrose por ac-

ción de las glucosiltransferasas [72, 53]. Los HePSs son compuestos de dos a ocho monosacáridos (la mayoría de glucosa, galactosa, ramnosa y fructosa) y son producidos en cantidades superiores a 2 g/L [20, 5]. Las glicosiltransferasas representan una clase esencial de enzimas, las cuales abundan en muchos organismos. Dentro del genoma de la mayoría de organismos, 1-3% de los genes codifican glicosil hidrolasas o glicosiltrasferasas. En miembros de la microflora del intestino humano, p. e. *Bacteroides fragilis* y *Bifidobacterium longum*, los genes codifican enzimas carbohidrato activas en niveles reportados de 4,8 y 3,6% del genoma, respectivamente [19]. Las enzimas con actividad sobre carbohidratos se clasifican entre 78 familias basadas en la secuencia de glicosiltransferasas, comprendiendo normalmente alrededor de 16.000 ORF (“**open reading frame**”) [19]. Los HoPSs de bacterias están compuestos de monosacáridos como la glucosa (glucanosa) o fructosa (fructana) y son sintetizados a partir de glucosa a través de la acción de una enzima perteneciente al grupo de las glucosiltransferasas (glucansucrasas). Las enzimas involucradas en la biosíntesis de glucanas y fructanas son denominadas también glicosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs), respectivamente [41]. El metabolismo de la sacarosa vía FTF o GTF no solo sirve para la formación de EPS, sino que también afecta el balance de óxido-reducción y la energía de generación [54]. La producción depende de la especie usada, de la concentración de sacarosa y de las condiciones de crecimiento. Además de sintetizar polisacáridos de altas masas moleculares, las glicosiltransferasas catalizan también la producción de oligosacáridos [41].

La mayoría de polisacáridos usados en la industria de alimentos como agentes espesantes, estabilizantes, texturizantes y gelificantes frecuentemente son derivados de plantas (como almidón y sus derivados modificados, pectina y goma arábiga) o de semillas (como alginato y carragenina). El interés de la industria de alimentos es desarrollar estos aditivos multifuncionales, los cuales, por una parte proporcionan mejorías deseadas en la textura y, por otra, tienen propiedades nutricionales adicionales. Así, la industria aplica grandes esfuerzos en la investigación para comprender las relaciones entre estructura/función de los exopolisacáridos –EPS. Este conocimiento es un pre-requisito para la síntesis de polisacáridos adaptados o personalizados, para ciertas aplicaciones tanto en alimentos como en la industria no alimentaria [54].

Muchas bacterias lácticas –BAL- poseen la capacidad de producir exopolisacáridos –EPS- cuando son fermentadas en medios apropiados [9, 100, 113, 35, 12, 36]. A pesar del importante papel que las BAL juegan en la industria de alimentos, hasta hace algunos años era poca la atención que se prestaba a la producción de EPS con grado alimenticio por este tipo de microorganismos [100].

Algunas veces las BAL, productoras de EPS, son las responsables de la turbidez y las viscosidades indeseables en productos alimenticios como el vino, la cidra y la cerveza [100]. Estos polímeros de azúcares llaman la atención al evocar efectos negativos asociados con la degradación de alimentos; por ejemplo, el taponamiento de tuberías por dextranas y levanas en la industria azucarera, películas en bebidas dulces vencidas, así como, la formación de biopelículas de mutana, la cual está relacionada con la adhesión de la microflora oral causante de caries en la superficie de los dientes. Sin embargo, en muchos casos los polisacáridos liberados

extracelularmente por bacterias lácticas pueden ofrecer ventajas en una variedad de productos alimenticios fermentados [9, 54]. Por otro lado, estos EPS exhiben características interesantes que se extienden, desde la mejora en la textura y palatabilidad, hasta el incremento de la vida útil del alimentos, además de ofrecer propiedades promotoras de la salud [51, 52, 110].

Dentro de los primeros biopolímeros producidos a escala industrial, se encuentran las dextranas sintetizadas por *Leuconostoc mesenteroides*, de gran aplicación en la medicina, tecnologías de separación y biotecnología. En las últimas décadas, otros EPS de origen microbiano han sido descritos como alternativa de uso de los polisacáridos de plantas. Xantana de *Xanthomonas campestris* y gelanade *Sphingomonas paucimobilis* son ejemplos de polisacáridos producidos en grandes cantidades, por bacterias no lácticas. Estos EPSs han tenido variadas aplicaciones en alimentos y no alimentos [102].

Las dextranas son polisacáridos neutros y químicamente inertes, compatibles con la mayor parte de los alimentos [6]. Esos polisacáridos son producidos por microorganismos de la familia *Lactobacillaceae*, de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y principalmente *Leuconostoc*. La dextrana de masa molecular media tiene potencial para ser utilizada en las industrias química (redes moleculares cruzadas y empaquetado de columnas cromatográficas de exclusión molecular) y de alimentos (inhibidor de cristalización en helados, homogeneizador y espesante en dulces y jarabes) [99, 91]. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Dextranicum* producen dextranas en rendimientos elevados, usando la enzima extracelular dextrana-sacarasa durante el metabolismo de la sacarosa [73, 92].

Dada la seguridad natural intrínseca de la mayoría de BAL, el interés en estudiar nuevos EPSs para aplicaciones en alimentos y medicina, se ha iniciado ahora un fuerte retorno (“comeback”) a estas bacterias. Al mismo tiempo, la mayoría de los EPS producidos por lactobacilli fueron aislados de productos lácticos como las leches fermentadas, yogur y granos de kéfir [20] y una gran proporción de especies productoras también se aisló de cereales fermentados y del tracto intestinal [109, 111, 54]. La producción de polisacáridos librados extracelularmente por algunas BAL ha ganado interés en los últimos años por contribuir en las propiedades reológicas, proveer textura de productos alimenticios [11, 93], viscosidad y retención de humedad en alimentos fermentados para eliminar problemas como la sinéresis, frecuente en este tipo de productos [85, 12, 36, 71]. Diversos autores describen algunas de las especies productoras de exopolisacáridos (EPS) que son más utilizadas en la producción de leches fermentadas para mejorar sus propiedades reológicas [20, 84, 98, 12, 36].

La naturaleza de los productos fermentados varía de una región a otra. Estos dependen de la microflora indígena local, la cual se refleja alternadamente, según las condiciones climáticas del lugar. Así, se encontró que en leches fermentadas tradicionales de lugares fríos, prevalecen bacterias mesófilas tales como *Lactococcus* y *Leuconostoc spp.*, mientras que bacterias termófilas, que incluyen especialmente *Lactobacillus* y *Streptococcus*, prevalecen en regiones con climas caliente, subtropical o tropical [108, 103, 55, 93].

En muchos casos, los EPS por LAB ofrecen ventajas en una variedad de productos como yogur, kéfir y otras leches fermentadas y son los responsables por su viscosidad – ropiness- [9, 93]. De hecho, en vez de usar aditivos como mejoradores de textura, estabilizantes, emulsificantes, gelificantes o agentes anti-sinéresis en alimentos fermentados, puede ser conveniente usar bacterias lácticas productoras de EPS como cultivos *starter* [100]. En lo concerniente a seguridad alimentaria, puede ser interesante abolir el uso de este tipo de aditivos y reemplazarlos por EPSs, producidos por BAL en los cultivos *starter* y, dado que los EPSs son producidos *in situ* durante el procesamiento del producto, estos no son considerados como ingredientes [113, 109].

Los EPS interactúan con las micelas de caseína, mejorando la textura del yogur, incrementando la viscosidad y disminuyendo la susceptibilidad a la sinéresis [40, 36]. Mezclas de culturas de bacterias lácticas mesófilas que contienen cepas de *Lc. lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* son generalmente utilizadas en la fabricación de queso fresco para producción de ácido, compuestos de aroma y de textura [62, 36].

Se le ha atribuido a algunas bacterias lácticas, productoras de EPS, efectos benéficos a la salud [13]. Algunas especies de BAL proporcionan microflora benéfica al intestino humano [89], así, además de las funciones tecnológicas, también tienen funciones probióticas [106, 93]. Los lactobacilos son comúnmente empleados como *starters* en la manufacturación de productos lácteos, siendo el caso del *Lactobacillus rhamnosus ssp* que es una especie productora de EPS con potencial probiótico [25, 63, 12]. Otras especies con potencial de producción de EPS son los *Lactococcus lactis ssp* [113, 12, 36]; *Leuconostoc ssp.*, *Leuconostoc fructosum*, *Leuconostoc mesenteroides ssp* [6, 92, 42, 12]; *Pediococcus acidilactici* var [100] y *Propionibacterium* como *Propionibacterium freudenreichii ssp* [47, 75, 107, 35,60], los cuales son de interés por sus efectos estimulantes sobre probióticos y por ser, también, productores de vitamina B12 [107].

Las propionibacterias de productos lácteos son microorganismos de grado alimenticio productoras de exopolisacáridos. Sin embargo, esos EPS han sido poco estudiados en relación con los de las bacterias lácticas. [96] utilizó medidas de viscosidad para monitorear la producción de EPS en medios de cultivo. [16] aisló polisacáridos producidos por *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* ATCC9614, cuya composición era galactosa (39%), glucosa (4%), metilpentosa (39%). [33, 34, 35 y 81] estudiaron la producción de EPS por *Propionibacterium acidi-propionici ssp*. Esos EPS no presentan capacidad de gelificación, pudiendo ser usados para formar fluidos más densos y viscosos [35].

Según [12], es posible controlar la población final de bacterias productoras de EPS -o de aroma- a través del ajuste de las tasas de inoculación de los cultivos, dado que mayores niveles de inóculo afectan positivamente el aroma y la viscosidad de productos lácteos. La temperatura de fermentación tuvo efecto significativo positivo sobre la viscosidad aparente; sin embargo, ocurrió mayor sinéresis. Dentro del rango de 23,5 a 36,5 oC, temperaturas más bajas promovieron el crecimiento de *Leuconostoc* y *Lc. lactis. ssp. cremoris*, mientras que

altas temperaturas favorecieron *Lb. rhamnosus* y *Lc. lactis* ssp. *lactis*, siendo estos últimos asociados a la producción de EPS e incremento de la viscosidad.

Para *Lactococci*, [84] sugiere que, una población superior de 108 ufc/mL es necesaria para que los cultivos productores de EPS afecten significativamente la textura de leches fermentadas. Para *Lb. rhamnosus*, aumentos significativos en la viscosidad aparente en pH 6,0 solo se hicieron evidentes cuando la población fue mayor a 109 ufc/mL [63]. Según [4], un pH final menor llevó al aumento en la viscosidad del yogur debido a una estructura de gel más firme, resultado de la coagulación ácida de las micelas de caseína en pH bajo y/o mayor producción de EPS por *L. rhamnosus*.

A partir de productos fermentados tailandeses, [100] aisló dos especies de *Pediococcus pentosaceus* que producían altas cantidades de EPS debido a la fermentación en medio MRS enriquecido con sacarosa. Este autor encontró que BAL aisladas de diferentes productos fermentados tailandeses fueron seleccionadas para la producción de EPS. De 104 cepas aisladas de BAL, dos bastones y cinco cocos tuvieron capacidad de producción de EPS a partir de sacarosa en medio sólido. Sin embargo, solo los cocos fueron capaces de producir EPS en medio líquido y fueron identificados como *Pediococcus pentosaceus*, especies AP-1 y AP-3, las cuales sintetizaron EPS en alta producción. Con base en la composición de azúcares, el análisis de mutilación y espectroscopia nuclear de resonancia magnética, los dos EPSs mostraron pertenecer al mismo tipo de dextrana. En detalle, los dos EPSs difirieron de la dextrana linear por ramificación a través de los residuos 3,6-di-O reemplazados y a-D-glucopyranosyl. El EPS de *P. pentosaceus* AP-3 se caracterizó por un relativo grado más alto de ramificación y un mayor peso molecular en relación a *P. pentosaceus* AP-1.

De acuerdo con [70] los probióticos *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 / *L. acidophilus* LAC 4 / *B. longum* BL 04, en cultivo puro o mixturado, durante la fermentación de extracto hidrosoluble de soya, aumentaron los recuentos con el tiempo, paralelamente: caída del pH, transformación de azúcares no reductores en reductores por la actividad metabólica microbiana, consumo de las fuentes de carbono y conversión de azúcares a ácidos orgánicos. Los máximas recuentos de células fueron observados en el rango de pH entre 4,3 y 5,5 en todas las fermentaciones. Cuando los medios alcanzaron pH entre 5,8-6,0 e inferiores, ocurrió la desnaturalización de las proteínas solubles de la soya y se observaron cambios en la consistencia y color del producto fermentado por la formación de un coágulo. La alta concentración de azúcares en el medio enriquecido con fructooligosacáridos - FOS - causó una rápida caída del pH, que con el tiempo llevó a la inhibición del crecimiento de los probióticos, cambios sensoriales y sinéresis del producto durante la vida de anaquel. Productos elaborados a base de leche bovina y de soya, fermentados con bacterias lácticas, presentan problemas de estabilidad durante la vida de anaquel, causados por la actividad de los microorganismos vivos allí presentes. [71] estudió la estabilidad de bebidas de soya fermentadas por *L. rhamnosus*, considerado productor de EPS y bacteria láctica prebiótica. Este fue inoculado puro y en mixtura, durante 30 días de almacenamiento. Se realizaron análisis de viabilidad de las bacterias, sinéresis, pH, consumo de azúcares, viscosidad y cantidad de EPS y se encontró que no existe relación entre la cantidad y la calidad de EPS en cuanto a retención de agua; *L. rhamnosus* se mostró

como productor de EPS con características aceptables para la disminución de la sinéresis en el extracto de soya fermentado con mixturas de probióticos. Según [36], la producción de EPS por cultivos combinados fue tres veces menor que en culturas puras. Al contrario de los resultados alcanzados por [36], para [71] la concentración de EPS obtenida fue mayor en los fermentados de *L. rhamnosus* en presencia del mix de probióticos. Obtuvo concentraciones de EPS de hasta 4270 mg/L, que son altas al compararlas con los resultados de EPS de *L. lactis subsp. lactis* de [8] y [9] (100-600 mg/L) y de EPS de *Streptococcus thermophilus* en medio MRS, sustituyendo glucosa por lactosa

75 g/L de [93] Savadogo et al., 2004 (814 mg/L). [64] obtuvo hasta 2775 mg/L de EPS de *L. rhamnosus* RW-9595M en medio mínimo basal compuesto por suero y extracto de levadura enriquecido con vitaminas, sales y aminoácidos. Sin embargo, la comparación de estos resultados se dificulta debido a las diferentes técnicas de extracción y cuantificación de EPS utilizadas por cada autor, sumado al de difícil separación durante el análisis [32](Goh et al 2005). Según [64], la producción de EPS por bacterias lácticas es influenciada por la composición del medio de crecimiento, particularmente de aminoácidos, minerales, vitaminas y bases nitrogenadas, la cual está relacionada a la producción de biomasa, encontrándose algunas excepciones. Así, se han realizado diversas tentativas para aumentar la producción de EPS, como alteración de la composición del medio, como fuentes de carbono. Se ha probado que sales de Mg^{2+} y Mn^{2+} son factores esenciales para el crecimiento de lactobacilos y que mejoran la producción de EPS, al menos a través de la promoción del crecimiento. El Mg^{2+} , por ejemplo, influye en la actividad de la enzima fosfoglucomutasa, que participa en la biosíntesis de EPS, catalizando la transferencia de grupos fosfato entre los carbonos C1 y C6 de la glucosa [64]. Así, como el extracto hidrosoluble de soja, al ser un medio complejo, rico en aminoácidos, vitaminas y sales minerales (~216 mg/L de Mg^{2+} y ~2,68mg/L de Mn^{2+} , [74]), puede explicarse la obtención de resultados elevados de EPS. Por otro lado, la leche bovina integral tiene 100mg/L de Mg^{2+} y trazos de Mn^{2+} [74].

Se han estudiado y usado por muchos investigadores diferentes técnicas para la determinación de EPS en las últimas dos décadas [24, 9, 23, 22, 81, 37, 65, 66, 7, 20, 112, 25, 34, 35]. Todos estos métodos envuelven la combinación de técnicas para aislar, purificar y cuantificar los EPS en un medio de cultivo. Algunas de las técnicas usadas para aislar y/o purificar EPS incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración, diafiltración, centrifugación, diálisis, ultrasonido y liofilización.

Las técnicas comunes usadas para precipitación de EPS incluyen etanol, acetona, propanol, isopropanol, bromato cetiltrimetilamonio (CTAB) y 3,5,6-trifenil-2,3,5,6-tetraaza biciclo-1-hexeno (comercialmente conocido como Nitron, [2]). En medios de cultivo que contienen proteínas, se emplean comúnmente el ácido tricloroacético (TCA) y los tratamientos enzimáticos, con el fin de precipitar e hidrolizar las proteínas, respectivamente. En secuencia al aislamiento y purificación, la cuantificación de los EPS emplea generalmente métodos de determinación de azúcares reductores totales, como el método fenol sulfúrico [24].

Muchos análisis son suficientes para la determinación de los niveles de EPS en medios de cultivos químicamente definidos. Sin embargo, un problema común en la estimación de los resultados de cuantificación de EPS, es la presencia de carbohidratos de bajo peso molecular (ex. lactosa, glucosa, etc) los cuales llegan a ser insolubles en etanol y, consecuentemente, son incluidos en el análisis de EPS.

También, en medios complejos que contienen leche, los valores de EPS son inexactos dado que los componentes no-EPS presentes en el medio, frecuentemente interfieren con el análisis. Durante la fermentación de la leche por BAL, el ácido láctico producido causa agregación de las partículas de caseína, y, por ende, la formación de un gel frágil. El gel en el cual las células bacterianas, lactosa y otros componentes menores quedan atrapados, es una estructura de red altamente compleja de proteínas y EPS. La separación cuidadosa del EPS de los componentes no-EPS, particularmente, proteínas, lactosa y células se hace necesaria [9], ya que la inclusión de cada uno de esos componentes puede influenciar los resultados de los métodos químicos empleados para la total determinación de carbohidratos. [10] reportó que el medio de cultivo con extracto de levadura puede interferir también en el análisis de EPS por la presencia de mananos. Frente a las anteriores consideraciones, las enzimas proteolíticas son usadas para la hidrólisis de proteínas; algunas de esas enzimas parecen poseer actividad glucanasa. Adicionalmente, algunos métodos no toman en cuenta la contribución del total de carbohidratos para las muestras control (blancos). Además, los regímenes de centrifugación aplicados en varios estudios no son apropiados. Los factores significativos en cada etapa de procedimiento para la determinación de EPS fueron estudiados por [32], e incluyen el uso de enzimas para la hidrólisis de proteínas en medios de cultivo a base de leche; el porcentaje óptimo de etanol en la precipitación de EPS es del, 70% , para solubilizar la lactosa, en la implementación de un régimen óptimo de centrifugación para el aislamiento efectivo del precipitado de EPS.

Alimentos funcionales

Según la “Agriculture and Agri-Food Canadá (AAFC)”, un alimento funcional y nutraceutico es aquel que, además de contar con funciones nutritivas básicas, tiene el potencial de traer beneficios fisiológicos demostrados a la salud humana o de reducir el riesgo de enfermedades crónicas. El término fue definido inicialmente en Japón, a mediados de los 80, como un alimento similar en apariencia a un alimento convencional; sin embargo, ha sido modificado con la adición de ingredientes que proveen efectos adicionales a la salud, mientras el nutraceutico es aislado del alimento y comercializado para dopaje [1].

El consumo regular de alimentos funcionales puede, potencialmente, reducir la probabilidad de ocurrencia de ciertos cánceres, enfermedades del corazón, osteoporosis, problemas intestinales y muchos otros problemas de salud [1,114].

Los ingredientes funcionales pueden estar naturalmente presentes en todos los alimentos, no solo en los enriquecidos o modificados [39, 90]. El Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias limita los alimentos funcionales a aquellos en los que las concentraciones de uno o más ingredientes fueron manipulados o modificados para realzar su contribución en una dieta saludable.

El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida de Norte América (ILSI) también define los alimentos funcionales como aquellos que, en virtud de sus componentes fisiológicos activos, proveen beneficios a la salud, además de la nutrición básica [1]. Los prebióticos y probióticos son alimentos funcionales, pues ofrecen beneficios al mejorar la digestión [90].

Con la emergente resistencia a antibióticos por bacterias y la procura por caminos naturales para suprimir patógenos, el concepto de probióticos ha atraído mucho la atención [107]. Los probióticos son mono o culturas mixtas de microorganismos vivos que, ingeridos en números suficientes, afectan benéficamente al hospedero, ya que mejora el balance en la microflora endógena del intestino [29]. El término “Probióticos” fue redefinido por [95] como organismos vivos que después de la ingestión en ciertos números ejerce beneficios a la salud, además de la nutrición básica inherente. Niveles altos (mayores de 10^7 g⁻¹ o mL⁻¹ o 109 UFC por porción segundo [76]) de microorganismos vivos son recomendados para productos probióticos [56]. A estos se les ha atribuido un número de beneficios terapéuticos incluyendo el control de la diarrea, mejoras en la utilización de la lactosa en intolerantes, así como en la respuesta inmune. Diarreas graves en niños en centros de salud en Francia fueron controladas gracias al consumo de leche fermentada con *L. casei* [77]. Una sustancia antimicrobiana producida por una cepa seleccionada de *L. acidophilus* se activó contra el *Helicobacter pylori* tanto in vivo como in vitro [88]. La producción de grandes cantidades de ácidos orgánicos de cadenas cortas y sustancias inhibitorias de bajo peso molecular, como peróxido de hidrógeno, reuterina, bacteiosinas y exclusión competitiva de patógenos por la ocupación de sitios de enlace, es uno de los mecanismos por los cuales los probióticos controlan la flora intestinal [97]. *L. casei*, *B. longum* y *Lactobacillus* GG son fundamentales para el incremento de la respuesta inmunológica corporal [78]. Muchas investigaciones han observado mejoras en el aprovechamiento de la lactosa por intolerantes [56]. La tendencia reciente en manufacturación de productos es la combinación de prebióticos con probióticos, los cuales son substratos fermentables por los probióticos. Los probióticos no son digeridos por las enzimas humanas, pero estimulan el crecimiento y/o la actividad de uno o más números limitados de bacterias en el colon, mejorando así la salud del intestino del hospedero [107]. Los prebióticos incluyen inulina, lactulasa y oligosacáridos [116].

Simbióticos

Recientemente, ha habido un gran avance en el desarrollo de los llamados productos probióticos, prebióticos y *simbióticos* [61, 15,104]. Simbiótico es un producto alimenticio que contiene tanto ingredientes probióticos como prebióticos [30, 15]. La palabra simbiótico viene del inglés *syntrophism*, donde *syn* hace parte de la palabra *synergy*, o sinergia, y *biosis* de vida. Es la sinergia existente entre los agentes prebióticos y los probióticos; los primeros contribuyen para el crecimiento de los segundos [75].

Los productos que contienen una bacteria probiótica (lactobacilo y/o bifidobacteria) y prebióticos, o “neoazúcares”, son llamados simbióticos [82]. En el desarrollo de simbióticos es necesaria la selección de especies de microorganismos con una mejor capacidad de utilización de un determinado prebiótico, para obtener un efecto sinérgico en la implantación y proliferación de las bacterias deseables [27].

Un prebiótico como ingrediente alimentario debe cumplir ciertas características, tales como: no ser ni hidrolizado, ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal; poseer fermentación selectiva por bacterias potencialmente benéficas al colon, o sea, promover selectivamente el crecimiento y/o estimular la actividad metabólica de bacterias promotoras de la salud y no la de otras bacterias; alterar la composición de la microflora del colon a favor de una composición más saludable y, preferiblemente, inducir efectos benéficos para la salud del hospedero.

Los oligosacáridos, tales como los frutooligosacárideos (FOS) (Figura 1 A), β -d-fructanos, Gluco-oligosacáridos (GOS), Transgalacto-oligosacáridos (TOS), Iso-maltooligosacáridos (IMO) e inulina [28], mananooligosacáridos (pared celular de levaduras) cumplen con las condiciones de los prebióticos. Existen cerca de doce tipos de oligosacáridos con grado alimenticio en producción comercial, con excepción de los soya-oligosacáridos (producidos por extracción directa) y lactulosa producida por reacción de catálisis alcalina [31]. Los oligosacáridos, presentes en algunas leguminosas como la soya, son la rafinosa y estaquiosa que se caracterizan por ser indigeribles por el intestino humano, y poseer efecto prebiótico [94]. Recientemente, a la polidextrosa se le han atribuido efectos prebióticos. Es un polisacárido sintetizado por la polimerización randómica o aleatoria de la glucosa, en la presencia de cantidades menores de sorbitol y un catalizador ácido adecuado, bajo alta temperatura y vacío parcial [17, 49].

La síntesis de oligosacáridos es muy estudiada y existen patentes japonesas, brasileras [80] y europeas. Los oligosacáridos de grado alimenticio pueden ser producidos químicamente o usando enzimas, como la síntesis enzimática a partir de azúcares simples por la reacción de transglucosilación de plantas o de origen microbiológica [26].

Estos procesos, normalmente, producen un rango de diferentes oligosacáridos, que difieren en su grado de polimerización y algunas veces en la posición del enlace glucosídico. Sustratos no consumidos o monosacáridos están presentes después de la formación de los oligosacáridos, donde la remoción de estos azúcares contaminantes es hecha por procesos cromatográficos, obteniéndose oligosacáridos con alto grado de pureza [116].

Los oligosacáridos son azúcares con tres a diez unidades encadenadas por enlaces α (1-2) entre la fructosa terminal y la glucosa, los cuales pueden ser lineales o ramificados y se caracterizan por el número, tipo y secuencia de sus cadenas de monosacáridos [82, 104, 105].

Los α -galactósidos rafinosa y estaquiosa son otros oligosacáridos presentes en algunos vegetales como las leguminosas (Figura 1(B)), y se caracterizan por ser no digeribles por el intestino humano, con efecto prebiótico, siendo la causa de problemas digestivos como la flatulencia [94]. La mayoría de mamíferos no expresa la α -galactosidasa pancreática necesaria para hidrolizar los enlaces α -1,6 de estos azúcares. En granos de soya, los α -galactósidos representan 4-6% de masa seca [59].

[14, 44, 94 y 104] sostienen que la presencia de factores bifidogénicos en el extracto de soya como los oligosacáridos rafinosa y estaquirosa, así como algunos otros azúcares, como sacarosa, fructosa, glucosa y galactosa, vitaminas del complejo B y fuentes proteicas de nitrógeno, hacen del extracto de soya un medio complejo y un excelente sustrato para el crecimiento de probióticos.

Como el concepto de simbióticos es reciente, existen pocos estudios específicos respecto a la interacción entre pro y prebióticos. En general, las propiedades de los prebióticos pueden influenciar en el crecimiento y la supervivencia de los probióticos, afectando el crecimiento tanto de los probióticos como de los cultivos *starter* en conjunto. Esto lleva a considerar 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 determinado sustrato, lo que resulta ser una ventaja competitiva para el probiótico [87].

La supervivencia de *L. acidophilus* y especies del género *Bifidobacterium* se ve afectada por las especies que participan en la fermentación, debido a los metabolitos secretados por otros microorganismos. Según [18], la inhibición de las bifidobacterias en el yogur no tiene que ver con los ácidos orgánicos producidos o la presencia de peróxido de hidrógeno, sino con los efectos antagonicos entre los cultivos *starter*. Algunos estudios mostraron que sustancias producidas por *L. bulgaricus* causaban la disminución de *L. acidophilus* durante el almacenamiento en refrigeración del yogur; el peróxido de hidrógeno, producido durante la manufactura, es la principal sustancia que causa este antagonismo, comprobado por la disminución del efecto al adicionar catalasa, que algunos autores describen como una dramática pérdida de la viabilidad de *L. acidophilus* [58]. La superacidificación causada por *L. bulgaricus* durante el almacenamiento, también afecta la viabilidad de *L. acidophilus*. Según [86], la presencia de *L. bulgaricus* es la principal causa de la mortalidad de *L. acidophilus* y de *Bifidobacterium* ssp [61].

L. acidophilus y *B. bifidum* presentan un efecto sinérgico promotor de crecimiento; el segundo depende de otra bacteria láctica para asegurar su crecimiento. Cerca de diecisiete especies de bifidobacterias crecen en leche pura y quince tienen problemas para sobrevivir, por el hecho de poseer poca actividad proteolítica, necesitando de la adición de caseína hidrolizada o de co-cultivos con especies proteolíticas, como los lactobacilos, para crecer. Especies de *L. acidophilus* viven en excelente simbiosis con bifidobacterias ayudando estas últimas con estimulantes de crecimiento [61]. La mixtura de cepas vivas de *L. acidophilus* y especies del género *Bifidobacterium* usadas en producción de bio-bebidas es conocida como cultivos-AB. La mixtura de AB cultivos *co* *S. thermophilus* produce los llamados productos fermentados ABT [115].

La adición de factores bifidogénicos en la dieta humana, normalmente favorece en un aumento en la ocurrencia y/o número de bifidobacterias aisladas de la materia fecal, sugiriendo que el suplemento en la dieta debería ser implementada [15]. [69] verificó que la adición de “neoazúcar” a la dieta humana (15 g/día), provoca un incremento de diez veces de bifidobacterias en el intestino grueso; hubo una reducción de 0,3 unidades en el pH intestinal y disminución en el recuento de enterobacterias. [43] observó que administrando 8,8 g/día de “neoazúcar” aumentaría la producción de ácidos grasos de cadena corta.

[68] constató que la bifidobacteria posee una enzima hidrolítica conocida como inulina (β -2,1-D-fructano-fructanohidrolasa), que hidroliza los fructooligosacáridos -FOS-, al contrario de las enzimas digestivas de humanos y animales. Estudios realizados *in vitro* demostraron que *B. longum* tiene dificultades para metabolizar polímeros de cadenas largas, tales como la inulina. *B. adolescentis* metabolizó inulina de forma más eficaz que *B. longum*, pero *B. thermophilus* presentó mejor crecimiento y actividad inulina. *B. infantis* utilizó cadenas cortas de FOS; sin embargo, es incapaz de metabolizar polímeros de cadenas largas, con grado de polimerización mayor que 25.

Durante la adición de diferentes sacáridos y oligosacáridos en el proceso de la fermentación del extracto de soya, [14] verificó que solo la bifidobacteria obtuvo efecto estimulante al crecimiento de *B. longum*. El recuento aumentó de 8,50 a 8,86 (log UFC/mL) después de 48 horas de fermentación. La mixtura *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81 / *L. acidophilus* LAC 4 / *B. longum* BL 04 en la presencia de FOS después de 20 horas de fermentación, alcanzó una población de 10^{10} UFC/mL, siendo el recuento máximo para *B. longum* [70].

Un fenómeno de simbiosis es el que se presenta entre microorganismos de diferentes especies o géneros cuando uno ayuda al desarrollo del otro, como se observó para *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*- Estos microorganismos tienen una buena asociación, en la cual, el segundo, produce ácido butírico y ácido láctico que acidifican el medio,; *L. paracasei* consume estos metabolitos, manteniendo el pH entre 6 y 7 compatible para la sobrevivencia de las dos especies [70]. Los probióticos aprovechan mejor los nutrientes de medios complejos como la soya, especialmente cuando están asociados lactobacilos con bifidobacterias, generando relaciones simbióticas como la bio-disponibilidad de proteínas y la reducción de la acidez del medio por *L. acidophilus* y la bio-disponibilidad de azúcares por las bifidobacterias con la disminución de la inhibición de *L. acidophilus*, fortaleciendo su crecimiento. El crecimiento de *L. acidophilus* en extracto de soja aumentó de 10^7 para 10^{10} (UFC. mL⁻¹) cuando fue inoculado y fermentado en mixtura con *B. longum*, mostrando la simbiosis existente entre las dos especies, según [70].

De acuerdo con [68], las bifidobacterias poseen enzimas hidrolíticas conocidas como inulinas (β -2,1-D-fructano-fructanohidrolasa), que hidrolizan los fructooligosacáridos, en contraste con las enzimas digestivas humanas y animales. Especies de *Bifidobacterium* poseen alta actividad α -galactosidasa y β -galactosidasa [44, 94, 21] indicando que las bifidobacterias pueden ser usadas para procesos biotecnológicos empleando extracto de soya como sustrato y, así, obtener productos con bajos niveles de α -D-galactosil oligosacáridos y alquil aldehídos, como n-hexanal y pentanal, que dan un sabor desagradable -off-flavor-. [44] observó la reducción de rafinosa y estaquiosa y el incremento de monosacáridos cuando el extracto de soya fue fermentado por *B. infantis* CCRC y *B. longum* B6. Esto puede ser atribuido a la reacción hidrolítica catalizada por las α y β -D-galactosidasas producidas por las bifidobacterias. Con lo anterior, la fermentación de extracto de soya con bifidobacterias puede tener un aprovechamiento práctico para resolver los factores de flatulencia en los productos de soya.

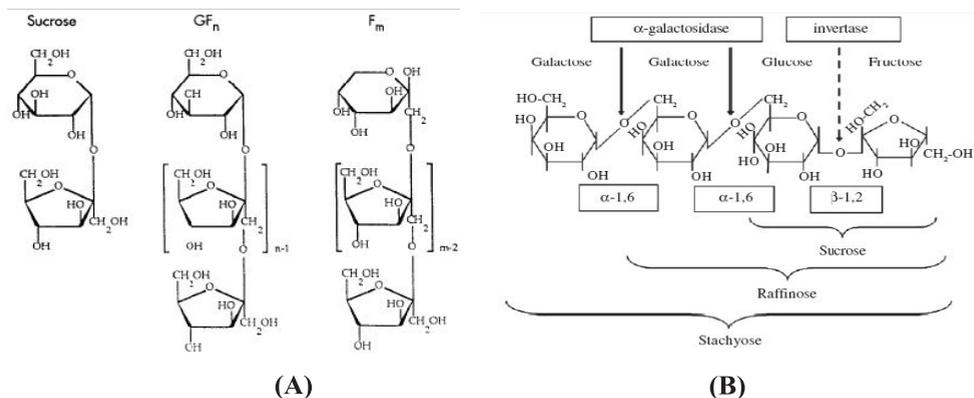


Figura 1. (A) Estructura química de los fructooligosacáridos: G, *glucosa*, F, *fructosa*, n o m indican el número de fructosas enlasadas a las moléculas [82]. n=1, kestosa, n=2, nistosa, n=3, 1F – fructofuranosilnistosa [116]. (B) Estructura de los α -galactósidos rafinosa y estaquirosa y las enzimas que catalizan su hidrólisis [59]

Los probióticos han sido usados, principalmente, por la especie humana como adjunto dietético, para reponer y/o prevenir el desbalance de la microbiota intestinal. Las principales especies empleadas para fines probióticos son bacterias del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*. Especies de *Enterococcus* y *Bacillus* también han sido utilizadas en la composición de algunos probióticos, además de *Bifidobacterium* [27].

Bacterias del género *Lactobacillus* actúan en el intestino delgado, mientras que el grupo bifidogénico actúa en el intestino grueso, marcadamente en la región del colon. La reintroducción de estos grupos microbianos en el huésped es hecha por medio de la administración de especies seleccionadas, que deberán estar en números elevados y viables en el momento de su consumo [83]. La Tabla 1 ilustra los principales efectos benéficos y terapéuticos atribuidos al consumo de probióticos.

Con el fin de que los microorganismos probióticos sean eficientes, deben ser rigurosamente seleccionados, pues existirán varias barreras por superar hasta el lugar en que deberán actuar. Para que una bacteria sea probiótica, debe cumplir ciertos requisitos, como los enumerados en la Tabla 1. Un probiótico de amplio espectro debe contener microorganismos que van a actuar en toda la extensión del tracto gastrointestinal. Para ejercer efectos probióticos, esas bacterias deben ser capaces de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal.

Algunos productos alimenticios que incluyen yogur con probióticos de yogur, productos de yogur con cereal, bebidas fortificantes, kéfir, helados de crema, postres fermentados y congelados a base de leche, yogures liofilizados, queso prebiótico tipo cheddar, leche en polvo deshidratada por “spray drying” frutas y jugos del bosque y bajos en colesterol “coleslaw” han sido empleados como vehículos para proveer probióticos. Se han probado almidones resistentes para mejorar la supervivencia de los prebióticos en yogur y en helados de crema bajos en

graso [50, 101, 38, 107]. Pero dada la presencia de peróxido de hidrógeno, los altos niveles de acidez, la producción de sustancias inhibitorias producidas por las bacterias del yogur (Lankaputhra et al, 1996; Dave & Shah, 1998), altos contenidos de oxígeno en los productos [57], daños causados por congelamiento y liofilización [58, 86], muchos de los productos mencionados anteriormente, no tuvieron éxito por no cumplir con los niveles de células viables de prebióticos requeridos. Salsas a base de queso (productos comercializados en Australia) pueden ser vehículos para transportar bacterias probióticas debido a su pH estable, a la capacidad tamponante de los ingredientes usados y a la presencia de prebióticos. La susceptibilidad para transportar *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* y *Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermanii* en dip fresco de ajo y cebolla a base de queso y los efectos de sus ingredientes (ácidos orgánicos, grasas y gomas, L-cisteína y Bicarbonato de Sodio) en la supervivencia de los probióticos fue estudiada por [107]. Encontraron niveles de inóculo de 8 log/g para *L. acidophilus* y *B. animalis* y 7 log / g para *L. paracasei subsp. paracasei* y/o *L. rhamnosus* para obtener mayor a 6 log de población bacterial individual final de la vida de anaquel. Cualquier combinación de estas bacterias puede ser empleada como probióticos en este producto.

Tabla 1. Efectos benéficos y aplicaciones terapéuticas atribuidas a las bacterias probióticas en humanos¹. Algunos criterios de selección de microorganismos probióticos²

<p>Efectos benéficos</p> <p>Mantenimiento de la microflora intestinal normal. Antagonista de crecimiento de patógenicos. Estimulación del sistema inmunológico. Reducción de la intolerancia a la lactosa. Reducción de los niveles de colesterol. Impedimento de la reabsorción de compuestos aminados indeseables. Desconjugación de ácidos biliares. Disminución de enfermedades coronarias. Actividad antimutagénica. Actividad anticarcinogénica. Actividad antitumorogénica. Mejora del valor nutricional de los alimentos. Efectos nutricionales.</p> <p>Aplicaciones terapéuticas</p> <p>Prevención de infección urogenital. Alivio de la constipación. Protección contra la diarrea de los viajeros. Prevención de la diarrea infantil. Reducción de diarrea inducida por antibióticos. Prevención de hipocholesterimia. Prevención de cáncer de colon y vejiga. Prevención de la osteoporosis..</p>	<p>Algunos criterios para la selección de microorganismos probióticos</p> <p>I) origen humana, II) resistencia al jugo gástrico, 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 patógenicas y carcinogénicas, IX) *seguros para uso clínico y alimenticio, X) números elevados de microorganismos probióticos, en el momento de su consumo, debiendo para esto, resistir a las condiciones de procesamiento (deshidratación, congelamiento, liofilización), XI) * validación clínica y con documentación de los efectos a la salud.</p>
--	---

¹ [29, 61]. ² [28 y 67]. ³ [87]

Ya conocido que la EPS puede ser ligada a propiedades probióticas de lactobacilos, existe el interés de industrias e investigadores en la adición de lactobacilos probióticos productores de EPS en quesos frescos. Normalmente, los lactobacilos son empleados en inóculos termofílicos

para la elaboración de quesos tipo Mozzarella y tipo Suizo, así como yogur. *L. rhamnosus* RW-9595 es una especie productora de EPS [25, 63], la cual puede crecer a 15 oC y ser usada con cultivos mesófilos. Muchas plantas productoras de queso tipo cheddar se diversifican de acuerdo con la demanda de los consumidores por características específicas de sabor y aroma. Hay por tanto gran interés de desarrollar alimentos funcionales con cultivos probióticos como inóculos para la elaboración de Cheddar. Generalmente, son empleados inóculos con *lactobacilli* y con cultivos citrato positivo como *lactococci*. Los cultivos *starter* son producidos a pH controlados para reducir los niveles de inóculo y prolongar su almacenamiento, lo que reduce los costos de los inóculos y permite mayor flexibilidad de uso. Sin embargo, los inóculos producido bajo pH controlado como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* o *Lc. Lactis* ssp. *cremoris* y sus mixturas, las cuales producen el aroma tradicional cuando crecen en leche con pH controlado, son limitados para especies citrato negativas. Adicionalmente, se ha demostrado que *Leuconostoc cremoris* y *Lactobacillus rhamnosus* no compiten bien con *lactococci* en medios de cultivo comerciales usados bajo control de pH externo. Por tanto, preparar mixturas de cultivos bajo pH controlado no es tarea fácil.

[12] realizó algunos estudios para mantener la producción de cultivos citrato negativas bajo pH externo controlado y también hacer posible la manufactura de quesos frescos con el aroma producido por los inóculos. Una alternativa propuesta fue la de inocular las leches destinadas a nuevas variedades de queso con cultivos congelados o liofilizados DVS (direct vat set) y los cultivos en combinación con *lactococci* en forma líquida. Quesos frescos, como el tipo Cottage, requesón, Minigoe y quesitos blandos (tipo petit suisse), así como los Camembert/Brie y Gouda/Edam, tradicionalmente contienen cultivos citrato positivo de *Ln. cremoris* o *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*.

Perspectivas futuras

Según [79], a partir de la acumulación de diversos estudios y constataciones, varios laboratorios, desde hace algunos años, intentaron reproducir moléculas con efectos probióticos en la BAL. Esta perspectiva comenzó lentamente a volverse realidad, gracias a los conocimientos acumulados en los últimos 15 años acerca de la genética de las BAL. Hoy, es posible inducir DNA en gran cantidad en BAL. Se desarrollaron, también, instrumentos genéticos en un amplio espectro de huéspedes (plasmidiso, transposons, sistemas de expresión inductibles, etc.) y se está realizando la secuencia de genomas de diversas especies de BAL. La idea es utilizar las BAL como vehículo de diversas actividades biológicas para luego introducirlas en el tubo digestivo. Una de esas puede ser la de producir enzimas para suplementar deficiencias pancreáticas o vitamínicas y, de esta manera, mejorar la salud del hospedero y ofrecerle mayor confort intestinal. Estas aplicaciones se sitúan en el área de desarrollo de productos de nuevos tipos de alimentos, o alimentos-salud o alimentos saludables. En esta categoría de productos, las BAL no serán solamente escogidas por su capacidad tecnológica, sino también por su actividad probiótica.

Para el futuro se podrá pensar en tipos de productos fermentados, con diferentes versiones según su contenido de BAL, adaptadas para suplir diversas deficiencias alimenticias y

facilitar, así, la digestión de ciertos glucósidos o suplantar nutrientes especiales. Una perspectiva particularmente atrayente es la de utilizar las BAL como vacunas vivas, intentando hacer que ellas produzcan antígenos o péptidos inmunogénicos capaces de inducir una respuesta inmunitaria contra un cierto patógeno. Esto sería una solución alternativa para controlar enfermedades endémicas causadas por numerosos virus y bacterias patógenas que entran al organismo por vía oral (como, por ejemplo, el agua potable y los alimentos) y se desarrollan en la mucosa digestiva. La mucosa digestiva es un órgano linfoide importante y la inducción de inmunidad a esta permite una lucha precoz contra numerosas infecciones. La noción de vacuna viva administrada oralmente es llamativa para el ámbito socio-económico, pues serían vacunas de fácil administración y bajo costo. Esos argumentos motivaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a apoyar el desarrollo de ese tipo de vacunas como objetivo prioritario de salud pública. En este tipo de aplicaciones, las BAL se constituirían en una nueva categoría de productos: bacterias-medicamentos.

Las prácticas alimenticias de numerosos grupos de individuos los conducen a ingerir altas cantidades de BAL. Esas bacterias absorbidas vivas son capaces de ejercer, en la mucosa intestinal, actividades biológicas inherentes a ellas. La demostración de un efecto biológico en el huésped es difícil, debido al hecho de que el nivel basal de esas actividades es muy bajo. Para remediar ese problema, se iniciaron varias investigaciones, superexpresando ciertas actividades en estas bacterias, con el fin de demostrar de manera absoluta sus efectos en el huésped. Este campo de investigación en salud pública es fascinante y promisorio. Con el interés actual por productos saludables es evidente que no se debe olvidar el clima de incertidumbre que envuelve el desarrollo de organismos genéticamente modificados. Se deben privilegiar las vías de autoclonaje que evitan la introducción de DNA extranjero. Dentro de ese panorama, se debe buscar riesgo cero para los consumidores y los productos oriundos de bacterias vacunas, para los cuales el riesgo de diseminación horizontal tiene que ser inferior a los riesgos que debe sufrir una población con la enfermedad expuesta a cierto patógeno. En este último caso, es importante buscar el desarrollo de sistemas de reclusión que impidan la sobrevivencia de las bacterias en el ambiente.

La actividad adyuvante de las BAL abre caminos interesantes para aplicaciones en el área médica. Otras actividades probióticas para las BAL fueron propuestas y las más interesantes son las anticolesterolemicas y antitumorales. Sin embargo, todavía son necesarias más experiencias e investigaciones para demostrar que las BAL ejercen, de hecho, esas actividades *in vivo*.

Conclusiones

- Como se detalló anteriormente, es evidente la amplia aplicación de las BAL, la cual abarca desde la producción de alimentos fermentados comunes, hasta aplicaciones terapéuticas a través de alimentos funcionales-saludables; asimismo, la obtención de subproductos de la fermentación de diversos sustratos y orígenes, para lograr bio-compuestos y demás derivados con diversas aplicaciones en la industria química, cosmética, farmacéutica y, principalmente, en la de alimentos. El ácido láctico es el principal producto de la fermentación de bacterias lácticas cuyas aplicaciones son diversificadas, entre las cuales se destacan, la conservación

y aroma de los alimentos fermentados, y la producción de biopolímeros y plásticos biodegradables. Existen evidencias de que las BAL ingeridas vivas y en cantidades importantes (cerca de 108 bacterias por gramo de alimentos fermentado) presentan efectos benéficos a la salud. Algunas de esas actividades están bien establecidas; otras, todavía necesitan de demostración clara y reproducible, tales como, el uso de recursos como las pruebas de duplo ciego y la inclusión de grupo placebo. Este tipo de estudio se dificulta, por lo general, porque, las especies bacterianas presentes en los productos fermentados son seleccionadas por medio de criterios tecnológicos y no probióticos. Además de esto, las actividades buscadas son frecuentemente de poca intensidad, quedando difícil evidenciarlas en un ecosistema complejo como el tracto digestivo. De ahí, la necesidad de intensificar las investigaciones en los diferentes campos de aplicación de la BAL, entre los que se destacan el genético, clasificación de especies con aplicaciones específicas, estudio de los procesos fermentativos, extracción, caracterización y purificación de subproductos del metabolismo, producción de biomasa, aplicaciones industriales, farmacéuticas, en alimentos y alimentos funcionales, validación de efectos y atribuciones terapéuticas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Referencias Bibliográficas

- [1] ADA Reports. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. Journal of the American Dietetic Association. v. 104, n.5, p. 814-826, 2004).
- [2] AZEREDO, J., & OLIVEIRA, R. A new method for precipitating bacterial exopolysaccharides. Biotechnology Techniques, v. 10, n.5, p. 341– 344, 1996.
- [3] BATT, C.A. Lactococcus. Department of Food Science, Cornell University, USA, 1999. Disponível em <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/LACTOCOCCUS.doc> Acessado em abril de 2007.
- [4] BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. Journal of Dairy Science, v. 82, p. 673–681, 1999.
- [5] BERGMAIER D, CHAMPAGNE CP, LACROIX C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of Lactobacillus rhamnosus RW-9595M. J Appl Microbiol. v. 98, p. 272–284, 2005.
- [6] BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P.A. Introdução à química dos alimentos. 2a ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995, 223 p.
- [7] BOUZAR, F., CERNING, J., & DESMAZEAUD, M. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. Journal of Dairy Science, v. 80, p. 2310–2317, 1997.

- [8] CERNING, J.; BOUILLANE, C; DESMAZEAUD, M.; LANDON, M. Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters*, v. 10, 225-260, 1988.
- [9] CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*, v. 87, p. 113-130, 1990.
- [10] CERNING, J., BOUILLANNE, C., LANDON, M., & DESMAZEAUD, M. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slimeforming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n.3, p. 692–699, 1992.
- [11] CERNING J, MARSHALL V.M.E. Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Recent Results and Developments in Microbiol.* v.3, p. 195-209, 1999.
- [12] CHAMPAGNE, C.P.; BARRETE, J.; ROY, D.; RODRIGUE, N. Fresh-cheesemilk formulation fermented by a combination of freeze-dried citrate-positive cultures and exopolysaccharide-producing lactobacilli with liquid lactococcal starters. *Food Research International*, v. 39, p. 651-659, 2006.
- [13] CHABOT, S.; YU, H.L.; DE LE'SE'LEUC, L.; COUTIER, D.; VAN CALSTEREN, M.R.; LESSARD, M. et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6, and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Lait*, v. 81, p. 683–697, 2001.
- [14] CHOU, C., HOU, J. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *International Journal of Food Microbiology*. v. 56, p. 113-121. 2000.
- [15] CRITTENDEN, R.G. & PLAYNE M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*. v. 7, p. 353-261, 1996.
- [16] CROW, L. Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation. *Applied Environmental microbiology*, v. 54, n.7, p. 1892–1895, 1988.
- [17] DANISCO. Danisco Sweeteners. Disponível em <http://www.daniscosweeteners.com/web/dsw/publicsite/presentation/home/home/index.html>. Acessado em novembro de 2006.
- [18] 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, 1998.
- [19] DAVIES GJ, GLOSTER TM, HENRISSAT B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. v. 15, p. 637–645, 2005.

- [20] DE VUYST, L. De; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, p. 153–177, 1999.
- [21] DESJARDINS M.L., ROY D., GOULET J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.* 73, 299-307, 1990.
- [22] DOCO, T., CARCANO, D., RAMOS, P., LOONES, A., & FOURNET, B. Rapid isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Research*, v. 58, n.1, p. 147–150, 1991.
- [23] DOCCO, T., WIERUSZESKI, J. M., & FOURNET, B. Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research*, v. 198, p. 313–321, 1990.
- [24] DUBOIS, M. A., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350–356, 1956.
- [25] DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 251–255, 2000.
- [26] EKHART P F E TIMMERMANS E. Techniques for the production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS). *Bulletin of the IDF*. v. 313, p. 59-64, 1996.
- [27] 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.
- [28] FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy journal*. v.9, p.53-61, 1999.
- [29] FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of applied Bacteriology*. v. 66, p. 365-378, 1989.
- [30] GIBSON, G R, ROBERFROID M.B. Dietary and modulation of human Colonic Microbiota: Introducing the concept of Prebiotics. *J. Nutr.* v. 125, p.1401-1412, 1995.
- [31] GIBSON, G. R. Non digestible oligosaccharides and bifidobacteria-implications for health. *International Sugar Journal*. v. 96, n.1150, p.381-387, 1994.

- [32] GOH K.T., HAISMAN D. R., ARCHER R. H., SINGH H. Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. *Food Research Internacional*. v.38, p. 605–613, 2005.
- [33] GORRET, N., MAUBOIS, J. L., ENGASSER, J. M., & GHOUL, M. Study of the effects of T, pH and yeast extract concentration on growth and EPS production by *Propionibacterium acidi-propionici* using a surface response methodology. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p. 788–796, 2001a.
- [34] GORRET, N., MAUBOIS, J. L., GHOUL, M., & ENGASSER, J. M. Exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidi-propionici* on milk microfiltrate. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p. 779–787, 2001b.
- [35] GORRET, N.; RENARD, C.M.G.C.; FAMELAN, M.H.; MAUBOIS, J.L.; DOUBLIER, J.L. Rheological characterization of de EPS produced by *P. acidici-propionici* on milk microfiltrate. *Carbohydrate polymers*, v. 51, p. 149-158, 2003.
- [36] GRATTEPANCHE F., AUDET P., LACROIX C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *International Dairy Journal*, v 17, n. 2, p. 123-132, 2007
- [37] GRUTER, M., LEEEXANG, B. R., KUIPER, J., KAMERLING, J. P., & VLIEGENTHART, J. F. G. Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in skimmed milk. *Carbohydrate Research*, v. 239, n. 0, p. 209–226, 1993.
- [38] HAYNES, I. N., & PLAYNE, M. J. Survival of probiotic cultures in low fat ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 57, p. 10–14, 2002.
- [39] HEAD R. J., RECORD I. R., KING R. A. Functional Foods: approaches to definition and substantiation. *Nutrition Reviews*, v. 54, n. 11, p. S17-S20, 1996.
- [40] HESS, S. J., ROBERTS, R. F., & ZIEGLER, G. R. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 252–26, 1997.
- [41] HERNAALSTENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microorganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Tesis (doctorado). Fac. Ing. de Alimentos Unicamp, Campinas, SP, 2006.
- [42] HERNALSTEENS S. Obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose por vía enzimática. Disertación (maestría). Fac. Ing. de Alimentos Unicamp, Campinas, SP, 2002.

- [43] HIDAKA H., HIRAYAMA M., YAMADA K. Fructooligosaccharides enzymatic preparation and biofunctions. *J. Carbohyd. Chem.*, v. 10, p. 509–522, 1991.
- [44] HOU J-W., YU R-C., CHOU C-C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research Internacional*. v. 33, p. 393-397, 2000.
- [45] JAN, G., BELZACQ, A.S., HAOUZI, D., ROUAULT, A., METIVIER, D., KROEMER, G., BRENNER, C. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ*. 9, p. 179–188, 2002a.
- [46] JAN, G., LEVERRIER, P., PICHEREAU, V., BOYAVAL, P., Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.67, p. 2029–2036, 2001.
- [47] JAN, G., LEVERRIER, P., ROLAND, N. Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: In vivo and in vitro investigations. *Lait*. v.82, p. 31–144, 2002.
- [48] JAN, G., ROUAULT, A., MAUBOIS, J.L. Acid stress susceptibility and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Lait* 80, p.325–336, 2000.
- [49] JIE Z, BANG-YAO L, MING-JIE X, HAI-WEI L, ZU-KANG Z, TING-SONG W, CRAIG SA. Estudo sobre os efeitos da ingestão de polidextrose sobre as funções fisiológicas em chineses. *Am J Clin Nutr*. v. 72, p. 1503-1509, 2000.
- [50] KAILASAPATHY, K., & RYBKA, S. L. *acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.—their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 52, p. 28–34, 1997.
- [51] KORAKLI M, ROSSMAN A, GÄNZLE MG, VOGEL RF. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *L. sanfranciscensis*. *J Agric Food Chem*. v. 49, p. 5194–5200, 2001.
- [52] KORAKLI M, GÄNZLE MG, VOGEL RF. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol*. v. 92, p.958–965, 2002.
- [53] KORAKLI M, PAVLOVIC M, GÄNZLE MG, VOGEL RF. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl Environ Microbiol*. v. 69, p. 2073–2079, 2003.
- [54] KORAKLI, M., VOGEL, R. F. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 71, p.790–803, 2006.

- [55] KURMAN J.A. The production of fermented milk in the world: aspects of the production of fermented milks. *Int. Dairy Federation Bull.* v.179, p. 16-26, 1994.
- [56] KURMAN, J.A., & RASIC, R. L. The health potential of products containing bifidobacteria. In R. K. Robinson (Ed.), *Therapeutic properties of fermented milks.* London: Elsevier Applied Food Science Series. 1991, pp. 117–158.
- [57] LANKAPUTHRA, W. E. V., & SHAH, N. P. Improving viability of *L. acidophilus* and bifidobacteria in yoghurt using two step fermentation and neutralised mix. *Food Australia*, v. 49, p. 363–369, 1997.
- [58] LANKAPUTHRA, W. E. V., SHAH, N. P., & BRITZ, M. L. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft*, v. 51, p. 65–70, 1996.
- [59] LEBLANC, J.G., SILVESTRONI, A. CONNES C., JUILLARD V. SAVOY DE GIORI, G., PIARD, J-CH., SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase. *Genetics and Molecular Research*, v. 3, n. 3, p. 432-440, 2004.
- [60] LEVERRIER P., FREMONT Y., ROUAULT A., BOYAVAL P., JAN G. In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices. *Food Microbiology*. v. 22, p. 11–18, 2005.
- [61] LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. v. 11, p. 1-17, 2001.
- [62] LUCEY, J. A. Acid and acid/heat coagulated cheese. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences.* London, UK: Academic Press, pp. 350–356, 2003.
- [63] MACEDO, M.G.; LACROIX, C.; CHAMPAGNE, C.P. Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. *Biotechnology Progress*, v. 18, p. 167–173, 2002.
- [64] MACEDO, M.G.; LACROIX, C.; GARDNER, N.J.; CHAMPAGNE, C.P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 419–426, 2002(b).
- [65] MARSHALL, V. M., COWIE, E. N., & MORETON, R. S. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC 330. *Journal of Dairy Research*, v. 62, p. 621–628, 1995.

- [66] MARSHALL, V. M., & RAWSON, H. L. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 34, p. 137–143, 1999.
- [67] MARTIN, J. H. Technical consideration for incorporating bifidobacteria and bifidogenic factors into dairy products. *International Dairy Federation Bulletin*. n. 313, p.49-51, 1996.
- [68] MACKELLAR RC, MODLER HW. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* sp. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 31, p. 537-541, 1989.
- [69] MODLER HW. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal*. v. 4. p. 383-407, 1994.
- [70] MONDRAGÓN-BERNAL, O L. Desenvolvimento de uma bebida fermentada de soja contendo agentes probióticos e prebióticos. Orientador: Francisco Maugeri. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp. 2004.
- [71] MONDRAGÓN-BERNAL O., HORITA J., COSTA, F., MAUGERI, F. *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharides (EPS) production and growth in soybeans water extract synbiotic beverage. *Journal of Biotechnology*. v.131S, p. S133–S187, 2007.
- [72] MONSAN P, BOZONNET S, ALBENNE C, JOUCLA G, WILLEMOT RM, REMAUD-SIMÉON M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J*. v. 11, p.675–685, 2001.
- [73] MURPHY, P.T., WHISTLER, R.L. Dextrans. In: Whistler, R.L., BeMiller, J.N. (Eds.), London: Industrial Gums, Academic Press, 1973, pp. 513–542.
- [74] NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO – NEPA. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO Versão 2 – Segunda Edição. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2006, 114 p.
- [75] OUWEHAND, A, LAGSTROM H SUOMALAINEN T SALMINEN S. Effects of probiotics in constipation. *Ann Nutr Metab*. v. 46, p. 159-162, 2002.
- [76] OWEHAND, A. Conferencia: Probiotics and prebiotics. VI simposio latinoamericano de ciencia de alimentos SLACA, Campinas 2005.
- [77] PEDONE, C. A., BERNABEU, A. O., POSTAIRE, E. R., BOULEY, C. F., & REINERT, P. The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN-114001) on acute diarrhea in children attending daycare centers. *International Journal of Clinical Practices*, v. 53, p. 179, 1999.

- [78] PERDIGON, G., DEMACIAS, M. E. N., ALVARES, S., OLIVER, G., & HOLGADO, A. A. P. R. Prevention of gastrointestinal infection using immuno-biological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy research*, v. 57, p. 255, 1990.
- [79] PIARD, J.C., LOIR, Y., POQUET, I., LANGELLA, P. TRADUCIDO POR AZEVEDO, V., BRUNIALTI, A. L. G. Bactérias Lácticas As Bactérias Lácticas No Centro Dos Novos Desafios Tecnológicos. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Encarte Especial*, p.80-84, 2003. Accesado em dezembro de 2007: <http://www.biotecnologia.com.br>.
- [80] PINHEIRO, Andreлина 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.
- [81] RACINE, M., DUMONT, J., CHAMPAGNE, C. P., & MORIN, A. Production and characterization of the exopolysaccharide from *propionibacterium acidipropionici* on whey-based media. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 71, p. 233–238, 1991.
- [82] ROBERFROID M.B., VAN LOO J.A.E., GIBSON G.R. The bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *J. Nutr.*, v. 128, p. 11-19, 1998.
- [83] ROBERFROID, M. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am.J Clin Nutr* 71(suppl):1682S-7S, 2000.
- [84] RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 163–171, 2002.
- [85] RUAS-MADIEDO P., GUEIMONDE M., REYES-GAVILA 'N C. G., SALMINEN S. Short Communication: effect of exopolysaccharide isolated from “Viili” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 2355–2358, 2006.
- [86] RYBKA, 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.
- [87] 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.
- [88] SAAVEDRA, J. M. Microbes to fight microbes: A not so novel approach to controlling diarrhea diseases. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 21, p. 125–129, 1995.

- [89] SALMINEN S, OUWEHAND A, BENNO Y, LEE Y K. Probiotics: how should they be defined?. *Trends in Food Science & Technology*. v.10 (3), p. 107-110, 1999.
- [90] SANDERS, M.E. Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria. *Int. Dairy Journal*, v. 8, p. 341-347, 1998.
- [91] SANTOS, V.M. Estudo das condições de hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica. Campinas, 1996. 108p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [92] SANTOS M., TEIXEIRA J., RODRIGUES A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*. v.4, p. 177–188, 2000.
- [93] SAVADOGO, A., OUATTARA, C. A. T., SAVADOGO, P. W., BARRO, N., OUATTARA, A. S., TRAERÉ, A. S. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*. v. 3, n.3, p. 189-194, 2004.
- [94] 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.
- [95] SCHAAFSMA, G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition News*, v. 5, p. 23–24, 1996.
- [96] SKOGEN, L. O., REINBOLD, G. W., & VEDAMUTHU, E. R. Capsulation of *Propionibacterium*. *Journal of Milk Food Technology*, v. 37,n. 6, p.314–321, 1974.
- [97] SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration, and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1–14, 2000.
- [98] SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 765–772, 2002.
- [99] SIDEBOTHAM, R.L. Dextran. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, v. 30, p. 371-444, 1974.
- [100] SMITINONT, T.; TANSAKUL, C.; TANASUPAWAT, S.; KEERATIPIBUL, S.; NAVARINI, L., BOSCO, M., CESCUTTI, P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology*, v. 51, p. 105-111, 1999.

- [101] STANTON C, GARDINER G, MEEHAN H, COLLINS K, FITZGERALD G, LYNCH PB, ROSS RP. Market potential for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* v. 73, p. 476-483, 2001.
- [102] SUTHERLAND IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* v. 16, p.41-46, 1998.
- [103] TAMINE A.Y. & ROBINSON R.K. Fermented milks and their future trends: technological aspects. *J. Dairy Res.* v. 55, p. 281-307, 1988.
- [104] TAMIME A., MARSHALL, V. ROBINSON, R.. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research.* v. 62 p. 151-187, 1995.
- [105] TAMIME Y. & ROBINSON,R. *Yogurt science and technology.* Cambridge: Woodhead Publishing Limited. Second edition. 2001. 368 p.
- [106] TANNOCK GW, MUNRO K, HARMSSEN HJ, WELLING GW, SMART J, GOPAL PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 66, p. 2578-88, 2000.
- [107] THARMARAJ N., SHAH N. P. Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. *International Dairy Journal.* v.14, p. 1055-1066, 2004.
- [108] THOMAS T.D. Role of lactic acid bacteria and their improvement for production of better-fermented animal products. *J. Dairy Sci. Technol.* v. 20, p. 1-10, 1985.
- [109] TIEKING M, KORAKLI M, EHRMANN MA, GÄNZLE MG, VOGEL RF. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* v. 69, p. 945-952, 2003.
- [110] TIEKING M, GÄNZLE M. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci Technol.* v. 16, p. 79-84, 2005.
- [111] TIEKING M, KADITZKY S, VALCHEVA R, KORAKLI M, VOGEL RF, GÄNZLE MG. Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *J Appl Microbiol.* v. 99, p. 692-702, 2005b.
- [112] TUINIER, R., ZOON, P., COHEN STUART, M. A., FLEER, G. J., & DE KRUIF, C. G. Concentration and shear rate dependence of the viscosity of an exocellular polysaccharide. *Biopolymers,* v. 50, p. 641-646, 1999.

- [113] TUINIER, R., OOMEN, C. J., ZOON, P., COHEN, M. A. S., KRUIF, C. G. Viscoelastic Properties of an Exocellular Polysaccharide Produced by a *Lactococcus lactis*. *Biomacromolecules*, v. 1, p. 219-223, 2000.
- [114] USPat. 6,033,691. CRAVERO, R. A. Marzo, 2000.
- [115] 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.
- [116] YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparations, and application. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 19, p. 107-117, 1996.