



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

PROBIOTICOS EN LECHE  
FERMENTADAS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERA EN ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
RUTH MARTINEZ VAZQUEZ

ASESORES: DRA. S. PATRICIA MIRANDA CASTRO  
DR. SALVADOR VEGA Y LEON

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005

m340580



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ruth Martínez  
Vázquez

FECHA: 15/11/2004

FIRMA: [Signature]



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE**

**ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Probióticos en leches fermentadas

que presenta la pasante: Ruth Martínez Vázquez  
con número de cuenta: 9232769-6 para obtener el título de :  
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Octubre de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>Dra. Susana Patricia Miranda Castro</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Clara Ines Alvarez Manrique</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>IA. María Guadalupe López Franco</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. María Eugenia Ramírez Ortíz</u>	

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios*

*Por darme el tesoro más grande que es la vida, por permitirme concluir una de mis metas y por rodearme de gente tan maravillosa que han hecho que valga la pena vivirla.*

*A mi alma mater, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*

*El formar parte de esta institución me ha brindado la oportunidad de extender mi conocimiento.*

*Orgullosamente UNAM.*

*Dra. Patty Miranda*

*En especial por su amistad y cariño, por brindarme palabras de aliento para terminar y sobretodo la paciencia mostrada, mil gracias.*

*Dr. Salvador Vega*

*Por su confianza, ayuda y guía en la realización de esta tesis, así como su amistad.*

*A mis sinodales, por la atención prestada en la revisión de esta tesis.*

*A mis profesores de la carrera, por contribuir en mi formación profesional y en especial a: Q. Florencia Vargas, Ing. Guadalupe López Franco, Ing. Rosalía Melendez, Dra. Clara Inés Manriquez, Dra. Silvia Estrada y Dr. Alberto Tecante.*

*A mis compañeros de la generación 19<sup>va</sup> cada uno me dejó algo que aprender, en especial: Socorro, Juan, José, Gabriel, Mario.*

*A Lic. Rommel y Sr. Guillermo, infinita gratitud, por su amor hacia un recinto tan indispensable para todo estudiante que es la biblioteca.*

## DEDICATORIAS

*A mi madre*

*Tu ejemplo, cariño y amor han sido piezas fundamentales en mi formación, gracias por tu dedicación y apoyo, por mostrarme que la constancia y perseverancia hacen posibles los logros. T.Q.M*

*A mi padre*

*Por que aún vives en tres semillas que de alguna manera han dado frutos. Tu ausencia lleno un gran cariño en mí.*

*A mis hermanas*

*Por que de alguna manera contribuyeron a no desistir en mi meta, por su cariño que es la fuerza que nos une. Las quiero mucho.*

*Munra*

*Toda una vida juntas, te dedico este trabajo por que sin ti, no podría haber concluido. Gracias por tu cariño, tus consejos, por compartir triunfos y fracasos, lágrimas y alegrías y sobretodo por ser el pilar en el que siempre me sostengo. T.Q.M tu mitad*

*FAM. Zavala*

*Alex, por ser mi amigo, cómplice y confidente. Diego y Santi por darme el cariño más puro que hay.*

*FAM. Hernández*

*Por su apoyo y cariño aun en la distancia.*

*FAM. Tellez*

*Por formar parte de mi familia.*

*FAM. Osorio*

*Por su cariño y apoyo, por que han sido participe de mi crecimiento a través de los años, dejar las travesuras en experiencias que podemos compartir. Tía Meche gracias por tus enseñanzas y sobre todo por tu cariño que es bien correspondido. Los quiero mucho.*

*Abuelitos*

*Por enseñarme la grandeza de la sencillez en la vida. "Esos son los Vázquez"*

*Lupis y Ulises*

*Son mi ejemplo más fidedigno de tenacidad, agradezco infinitamente el tenerlos conmigo.*

*Tíos y primos Vázquez*

*Mi cariño y respeto hacia cada uno de ustedes, en especial a: Jessica y Teresita que son ejemplo de fortaleza ante las adversidades.*

*Vieja Loca*

*El tiempo solo ha logrado arraigar los lazos irrompibles que nos unen, formas parte de la época más significativa de mi vida  
Gracias hermana.*

*Adriana*

*Por tu amistad, por formar parte de mi familia (comadre) y por hacer inolvidables la época universitaria, quién lo iba a decir que de ser las clásicas compañeras de equipo, a familia.*

*Claudia y Héctor*

*Me fue imposible separarlos por que hemos llegado a ser el clásico trío, uno para todos y todos para uno. Gracias por sostenerme cunado mis alas se rompieron. Los quiero mucho.*

*Iván Ávila*

*Mi agradecimiento y cariño, porque contribuiste piedrita con piedrita a la realización de esta tesis.*

*Don Luis (f)*

*Ejemplo de lucha. Por que en los momentos de titubeos me enseñaste que dejar de luchar por tus sueños es comenzar a morir.*

*Grupo Amhigo*

*Por darme el valor de llevar con entereza mi enfermedad. Rafa, Lulu, Martha, Angeles, Israel y a cada integrante mil gracias.*

## ÍNDICE

	PÁG.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
JUSTIFICACIÓN	4
<b>CAPÍTULO I. ALIMENTOS FUNCIONALES</b>	
1.1 Antecedentes	5
1.2 Definiciones	7
1.2.1 Alimentos funcionales	7
1.2.2 Nutracéuticos	8
1.2.3 Suplementos alimenticios	9
1.2.4 Alimentos adicionados	12
1.2.5 Fórmulas de alimentación especializadas	14
1.3 Clasificación de los alimentos funcionales	15
1.4 Probióticos	18
<b>CAPÍTULO II. MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES</b>	
2.1 Condiciones que debe reunir un alimento para ser considerado funcional	25
2.2 Tipos de marcadores	27
2.2.1 Características de los marcadores	28

2.3 Determinación de sustancias bioactivas	29
2.4 Ensayos clínicos	30
2.4.1 Ensayos clínicos realizados con probióticos	32

### **CAPÍTULO III. PROBIÓTICOS**

3.1 Antecedentes	34
3.2 Breve reseña histórica de los probióticos	37
3.3 Composición y distribución de la microflora gastrointestinal en el adulto	40
3.3.1 Funciones de la microflora del colon normal	43
3.3.2 Evolución de la microflora intestinal con la edad	45
3.3.3 Factores que afectan a la microflora intestinal	47
3.4 Microorganismos Probióticos	49
3.4.1 Características de probióticos	49
3.4.2 Selección de cepas probióticas	50
3.4.3 Importancia de las bacterias ácido lácticas	54
3.4.3.1 Taxonomía de las bacterias ácido lácticas	56
3.4.4 Vías metabólicas de las bacteras ácido lácticas	58
3.4.5 Identificación de cepas probióticas	62
3.4.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
3.4.5.2 Técnicas empleadas en la identificación de microorganismos probióticos	64
3.5 Bifidobacterias	65
3.6 <i>Lactobacillus</i>	68
3.6.1 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	69

3.6.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	71
3.6.3 <i>Lactobacillus brevis</i>	73
3.6.4 <i>Lactobacillus casei</i>	74

## CAPÍTULO IV. LECHE FERMENTADAS

4.1 Concepto de leches fermentadas	82
4.2 Variedades	85
4.3 Tecnología aplicada a la elaboración de leches fermentadas	88
4.4 Tipos de leches fermentadas según los microorganismos utilizados	90
4.4.1 Yogur	91
4.4.1.1 Tipos de yogur	92
4.4.1.2 Proceso de elaboración	98
4.4.2 Kefir	102
4.4.2.1 Granos de Kefir	104
4.4.2.2 Proceso de elaboración	107
4.4.2.2.1 Proceso tradicional	107
4.4.2.2.2 Proceso reciente	109
4.4.3 Yakult	111
4.4.3.1 Proceso de elaboración	111
4.4.4 Leche bifidus	113
4.4.5 Bioghurt, Biogarde, Bifighurt	113
4.4.6 Yogur Bifidus ó Yogur acidophilus	114

## **CAPÍTULO V. TRATAMIENTOS TÉRMICOS**

5.1 La cadena de frío	118
5.1.1 Viabilidad de las bacterias lácticas a lo largo de la cadena de frío	119
5.1.2 Actividad de las bacterias lácticas y modificación del producto a lo largo de la cadena de frío	122
5.2 La termización	125
5.2.1 Efecto de la termización sobre los fermentos lácticos	126
5.2.2 Consecuencias de la termización sobre la composición del producto, su evolución y sus cualidades	127

## **CAPÍTULO VI. DISPONIBILIDAD Y CONSUMO DE PROBIÓTICOS EN MÉXICO**

6.1 Mercado de lácteos fermentados probióticos	129
6.2 Oferta de probióticos en el mercado	131

## **CAPÍTULO VII. REGULACIÓN LEGISLATIVA EN ALIMENTACIÓN FUNCIONAL**

7.1 Antecedentes	135
7.2 Estados Unidos	140
7.3 Japón	142
7.4 Unión Europea	144

7.5 Aspectos legislativos relacionados a los productos probióticos	150
<b>CONCLUSIONES</b>	152
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	155

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales alimentos funcionales	16
Cuadro 2. Ejemplos de alimentos funcionales europeos	17
Cuadro 3. Efectos benéficos de los probióticos	22
Cuadro 4. Ensayos clínicos realizados con <i>L.acidophilus</i>	32
Cuadro 5. Ensayos clínicos realizados con Bífido bacterias	33
Cuadro 6. Ensayos clínicos realizados con <i>L.casei</i>	33
Cuadro 7. Definiciones publicadas de probióticos	40
Cuadro 8. Criterios de selección de bacterias probióticas	53
Cuadro 9. Tipos de fermentación ácido láctica	57
Cuadro 10. Características y distribución de bacterias ácido lácticas	62
Cuadro 11. Descripción de especies de <i>Bifidobacterium</i> en la especie humana	67

<b>Cuadro 12.</b> Microorganismos comúnmente utilizados en la elaboración de leches fermentadas	83
<b>Cuadro 13.</b> Microorganismos comúnmente utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados	84
<b>Cuadro 14.</b> Principales características de las leches fermentadas elaboradas en México	87
<b>Cuadro 15.</b> Microorganismos encontrados en el kéfir	106
<b>Cuadro 16a.</b> Evolución de las características de un yogur con dos fermentos diferentes en función de la temperatura de conservación	121
<b>Cuadro 16b.</b> Evolución de las características de un yogur con dos fermentos diferentes en función de la temperatura de conservación	121
<b>Cuadro 17.</b> Evolución de las características de una leche fermentada en función con su temperatura de conservación	122
<b>Cuadro 18.</b> Proteólisis del yogur a lo largo de la cadena de frío, expresada en agrupaciones aminadas libres, calculadas en $\mu$ moles de glicina/mL	123

<b>Cuadro 19.</b> Evolución del contenido de sacáridos (%) en un yogur a lo largo de su conservación a 5°C	125
<b>Cuadro 20.</b> Valores de termización	126
<b>Cuadro 21.</b> Producción de Yogur 1996-2004	131
<b>Cuadro 22.</b> Oferta de leches fermentadas comercializadas en México	133

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de un nutraceutico	9
<b>Figura 2.</b> Variación de las poblaciones y especies bacterianas a lo largo del tracto gastrointestinal humano en adultos en condición de no ayuno	42
<b>Figura 3.</b> Influencia de la flora intestinal sobre el huésped	48
<b>Figura 4.</b> Fermentación láctica homofermentativa	59
<b>Figura 5.</b> Fermentación láctica heterofermentativa	60
<b>Figura 6.</b> Regulación del metabolismo del piruvato	61
<b>Figura 7.</b> Microfotografías de bacterias probióticas	78
<b>Figura 8.</b> Diagrama de elaboración de yogur	101
<b>Figura 9.</b> Diagrama de elaboración de kefir	110
<b>Figura 10.</b> Leches fermentadas con microorganismos probióticos en México	134

## INTRODUCCIÓN

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además de su composición nutrimental aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los alimentos funcionales. Otros factores que también contribuyen en el "boom" de los alimentos funcionales incluyen los grandes avances tecnológicos, entre ellos la biotecnología, así como la investigación científica que documenta los beneficios para la salud de estos alimentos (Alvídrez, 2002).

Dentro del campo de los alimentos funcionales se encuentra el grupo denominado probióticos, cuando éstos son incorporados en alimentos como parte del proceso de elaboración o como aditivos, se generan alimentos funcionales. Las leches fermentadas además de su amplia aceptación como alimentos nutritivos, sabrosos y convenientes, han sido utilizadas en forma creciente como el principal vehículo para las bacterias con características probióticas en los humanos en el transcurso de las últimas dos décadas (García, 2003). La inmensa variedad de complementos que se les pueden añadir permite ofrecerle al consumidor una amplia gama de productos. En este tipo de productos la funcionalidad fisiológica está ligada a las bacterias lácteas y los productos metabólicos que resultan de su interacción con el medio lácteo (Mazza, 2000). Lo anterior justifica plenamente el propósito

de utilizar, en la elaboración de productos lácteos fermentados, cultivos originarios de la microflora intestinal residente; de estos cultivos.

Las bacterias que tienen la capacidad de implantarse en la flora intestinal pertenecen a los géneros *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, así como algunas especies de bifidobacterias, son las que pueden considerarse como las bacterias probióticas típicas, y las que más interés han despertado.

Entre los beneficios de los microorganismos probióticos sobre los cuales existe información científica más sólida se encuentran: disminución de la incidencia de infecciones gastrointestinales, incremento de la respuesta inmune del consumidor, así como la reducción de la incidencia a cáncer de colon, y la eventual reducción de colesterol en la sangre entre otros (García, 2000).

Las reglamentaciones de los gobiernos difieren entre países, en la actualidad no se ha establecido a nivel internacional la situación de los probióticos como ingredientes de los alimentos. En su mayor parte, los probióticos se presentan en forma de alimentos lo cual sólo pueden hacerse declaraciones de propiedades saludables de carácter general ([www.fao.org](http://www.fao.org))

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Revisión bibliográfica teórica y técnica sobre los probióticos en la elaboración de leches fermentadas, su importancia como ingredientes funcionales, aspectos tecnológicos, legislativos y su impacto que pueden tener en la mejora nutricional y en la salud de la población.

### **OBJETIVO PARTICULAR 1**

Establecer el concepto de alimento funcional de otros conceptos (nutracéuticos, suplementos, etc.), que permita el entendimiento de estos alimentos como ingredientes funcionales, así como las características que deben cumplir.

### **OBJETIVO PARTICULAR 2**

Analizar los métodos utilizados para el estudio de los ingredientes funcionales con la finalidad de establecer la eficacia y la inocuidad de estos productos.

### **OBJETIVO PARTICULAR 3**

Analizar el uso de los probióticos en la elaboración de alimentos funcionales como las leches fermentadas, partiendo de la importancia en la selección e identificación de la cepa, así como los aspectos de proceso y almacenamiento.

### **OBJETIVO PARTICULAR 4**

Conocer las diferentes legislaciones sobre alimentos funcionales que conllevan a la necesidad de crear una regulación que permita uniformar las terminologías empleadas y el uso de declaraciones sobre la salud.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente demanda por consumir alimentos que le confieran beneficios a al consumidor en la prevención de enfermedades ha dado auge a los llamados alimentos funcionales.

El desarrollo de este tipo de productos por parte de la industria alimentaria constituye en eje de progreso prometedor. El grupo que más interés ha despertado a los productores ha sido el de los lácteos, este sector goza de gran popularidad entre los consumidores además de su disponibilidad y variedad, lo que los posiciona como productos innovadores de alta calidad.

El papel del Ingeniero en Alimentos como participe en la elaboración de estos productos, es pieza fundamental en la investigación y desarrollo para la formulación de nuevos productos lácteos fermentados, buscando la actualización en tecnologías afines, para conseguir mayores beneficios en la salud de la población.

Es importante señalar que la investigación debe ir de la mano al desarrollo de los productos, para que las declaraciones sobre salud que proponen los productores, estén avaladas por estudios serios y confiables.

CAPÍTULO I  
ALIMENTOS FUNCIONALES

# CAPÍTULO I

## ALIMENTOS FUNCIONALES

### 1.1 ANTECEDENTES

En los últimos años principalmente en los países desarrollados, ha crecido la preocupación por consumir alimentos inocuos que no se encuentren contaminados con microorganismos patógenos, o con sus toxinas, ni que contengan otros microorganismos que alteren sus componentes químicos, además que no estén contaminados con sustancias indeseables o bien, si lo estuvieran, que cumplan con los límites máximos de residuos permitidos que se han establecido luego de estudios exhaustivos que han demostrado su seguridad( Vega, 2002).

Por otro lado el interés de los consumidores por ingerir dietas para mantener su salud y prevenir en lo posible enfermedades crónico degenerativas como diabetes, cáncer, hipertensión y otras, ha sido influido cada vez más, por una corriente de opinión favorable hacia el consumo de alimentos naturales y no de procesados. Ello y otros factores han propiciado el estudio y desarrollo desde la década de los ochenta, de los llamados **alimentos funcionales** (Vega, 2002).

Ante la gran cantidad de información que circula en diversos medios es conveniente aclarar con base en información científica, técnica y legal dicho concepto y diferenciarlo de otros como es el caso de productos como los llamados nutracéuticos, suplementos alimenticios, alimentos adicionados (fortificados y enriquecidos) y fórmulas de alimentación especializadas (Vega, 2002).

Se considera que el concepto de alimentos funcionales, se desarrolló durante la década de los ochenta en Japón al momento es el único país que ha formulado un proceso regulatorio específico para la aprobación de alimentos funcionales. Conocidos como "alimentos para uso específico de la salud" (foods for specified health use" o FOSHU) (Vega, 2002).

A dichos alimentos se les permite llevar en su envase un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar de ese país. En la actualidad en el Japón hay más de 100 productos con licencia FOSHU.

Alimentos funcionales, alimentos diseñados y productos nutracéuticos son expresiones que se pueden usar indistintamente para referirse a alimentos o a ingredientes aislados que proporcionan determinados efectos fisiológicos beneficiosos no nutricionales que pueden mejorar la salud. Los alimentos están compuestos por millares de constituyentes biológicamente activos que pueden tener un efecto beneficioso para la salud (Mazza, 1998).

En las décadas recientes, se ha puesto mayor interés en los efectos benéficos potenciales de las leches fermentadas sobre la salud, Los productos lácteos han sido utilizados tradicionalmente como vehículo para las bacterias probióticas en los humanos. Las bacterias lácticas, muchas de las cuales están consideradas como probióticos, son el grupo de microorganismos más importante utilizado en la elaboración de leches fermentadas (Saloff-Coste, 1997).

Las leches fermentadas tienen efectos probióticos debido a que su consumo lleva a la ingestión de grandes cantidades de bacterias vivas que ejercen beneficios en la salud, que van más allá de la nutrición básica.

Los productos probióticos representan un área fuerte en crecimiento dentro del grupo de los alimentos funcionales y esfuerzos de investigación intensa están en marcha para desarrollar productos lácteos los cuales contengan microorganismos probióticos incorporados (Staton, 2001).

## 1.2 DEFINICIONES

### 1.2.1 ALIMENTOS FUNCIONALES

Algunas definiciones de alimentos funcionales son las siguientes:

- Alimentos que además de nutrimentos, aportan al organismo componentes que contribuyen a curar enfermedades o reducir el riesgo de desarrollarlas.
- Alimentos que se parecen a los alimentos convencionales, que producen efectos fisiológicos probados y/o reducen el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas.
- Todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir efectos metabólicos o fisiológicos demostrados, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, pudiendo auxiliar en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas degenerativas, además de aportar sus funciones nutricionales básicas.
- Son alimentos que contienen compuestos funcionales (Ejemplos: glutatión, vitamina A, ácido linoleico conjugado, etc.), que tienen beneficios

fisiológicos para el consumidor, además del valor nutritivo básico. Su objetivo es prevenir enfermedades crónicas y mantener el equilibrio natural de vitaminas y electrolitos del cuerpo (Vega, 2002).

Un alimento funcional puede ser un alimento natural; o uno al que se le han añadido componentes; o bien otro del que se han eliminado ingredientes mediante procedimientos tecnológicos o biotecnológicos. Puede ser también un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificado, o un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes se ha modificado, o cualquier combinación de las posibilidades antes señaladas.

Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos y poder consumirse en cantidades compatibles con una alimentación normal equilibrada y diversificada. En el mercado actual se ofrecen productos diversos que pudieran considerarse con los alimentos funcionales, ya que la intención del fabricante es mejorar la salud de los consumidores (Vega, 2002). Entre ellos se encuentran:

### 1.2.2 NUTRACÉUTICOS

Los llamados nutracéuticos se definen como sigue:

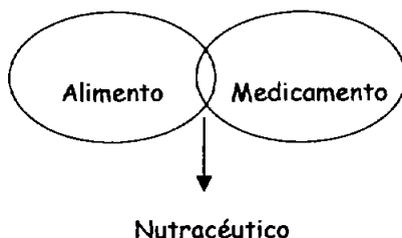
- Alimentos que se fabrican a partir de los alimentos comunes, que se venden en forma de preparados como píldoras, cápsulas, polvos, jarabes, bebidas, etc.

- Formas medicinales que generalmente no son asociadas a los alimentos y que pueden ejercer un efecto fisiológico benéfico o asegurar protección contra enfermedades crónicas (Vega, 2002).

En la figura No.1 se muestra la representación gráfica de lo que es un alimento nutraceutico.

Figura. 1

#### Representación gráfica de un nutraceutico



Fuente: Vega; 2002

#### 1.2.3 SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS

Tampoco se deben considerar como alimentos funcionales a los suplementos alimenticios ya que de acuerdo con el título único, capítulo XIX del nuevo Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 9 de agosto de 1999, se considera que los suplementos alimenticios podrán estar constituidos por hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, metabolitos, plantas, hierbas, algas, alimentos tradicionales, deshidratados u otros que establezca la Secretaría, presentarse ya sea de forma aislada o en combinación, adicionados o no con vitaminas o minerales, y su consumo no deberá presentar riesgos para la salud(Artículo 168).

Además los suplementos alimenticios no deberán contener sustancias como procaína, efedrina, yohimbina, germanio, hormonas animales o humanas, las plantas que no se permitan para infusiones o té o cualquier otra sustancia farmacológica mente reconocida o que presente riesgo para la salud. En el caso de contener sustancias poco conocidas, que puedan representar un riesgo o daño para la salud, el proceso e importación de los productos quedará sujeto a que se demuestre científicamente ante la Secretaría, la inocuidad de las mismas (Artículo 169)(Vega, 2002).

Las materias primas de los suplementos alimenticios, particularmente las plantas deshidratadas, deberán someterse a tratamientos, controles y procedimientos que abatan la flora microbiana que la acompaña y los residuos físicos y químicos que puedan dañar la salud (Artículo 170).

En el mercado de los suplementos alimenticios nacional como internacional, se encuentran productos muy diversos que satisfacen necesidades diferentes del consumidor, en las que destacan el perder o ganar peso, aumentar o disminuir la ingesta calórica, o aumentar la ingesta de proteínas.

El mercado de suplementos es vasto y en la actualidad existen productos claramente dirigidos para cada grupo de edad atendiendo a necesidades especiales (Vega, 2002).

El suplemento alimenticio tiene la función de sustituir temporalmente a una o varias de las comidas diarias de la dieta y se consumen para:

- Perder peso
- Durante enfermedades que impida la alimentación oral.

Los suplementos alimenticios también pueden consumirse como complementos en la dieta habitual del ser humano y se consumen para:

- Ganar peso
- Aumentar el consumo de energía (Vega, 2002).

Algunos ejemplos de suplementos e presentan a continuación:

- Suplementos elaborados con base en proteínas o aminoácidos (proteína plus, aminomix, amino fule)
- Suplementos elaborados a partir de hidratos de carbonos complejos y simples (energéticos).
- Suplementos elaborados a partir de lípidos o ácidos grasos.
- Multivitamínicos.

Los suplementos alimenticios se utilizan generalmente como ayudas ergo genéticas para los deportistas para optimizar procesos de pérdida o ganancia de peso, para preservar la salud o sentirse saludable, en etapas especiales de la vida como el crecimiento y desarrollo, embarazo, lactancia o sujetos enfermos(Vega, 2002).

#### 1.2.4 ALIMENTOS ADICIONADOS

Los alimentos adicionados mal llamados fortificados y/o enriquecidos, son aquellos alimentos en los que es posible agregar una gran cantidad de nutrimentos, se pueden adicionar compuestos inorgánicos como calcio, hierro, fluor y yodo y sustancias orgánicas como: los aminoácidos: lisina, metionina y triptofano, también las vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D y niacina, ácidos grasos indispensables como los omega 3 y 6 (Vega, 2002).

Además se pueden añadir polímeros, tal es el caso de las proteínas, así como incorporar a la formulación del alimento ingredientes como son aislado de proteína de soya y suero de quesería entre otros.

La adición de nutrimentos a los alimentos consiste en la restitución de los alimentos con sustancias nutritivas de bajo costo previamente obtenidas, extraídas, sintetizadas y purificadas.

La adición de nutrimentos no debe alterar las propiedades sensoriales y por lo tanto la aceptación de productos alimenticios por parte del consumidor o bien desestabilizar sus características químicas, propiciando el uso de medidas protectoras adicionales.

Además el añadido de nutrimentos debe obedecer a un interés genuino en el bienestar público y no sólo ser un reflejo de meros intereses comerciales o de demagogia (Vega, 2002).

El propósito de la adición es restituir la destrucción de uno o varios nutrimentos que sucede durante la elaboración del producto la acción esta justificada, pero si la adición tiene como único fin hacer más llamativo el producto, el propósito no es correcto.

Cuando se adicionan nutrimentos a niveles similares a los que contenía el alimento original antes de su procesado se debe llamar restitución o restauración, mientras que la adición debe ser el agregado de nutrimentos a los alimentos, aunque inicialmente no estuvieran en las materias primas o se encontraran en mínimas cantidades (Vega, 2002).

Algunos ejemplos sobre la restitución de nutrimentos a los alimentos originales son los siguientes:

**PAN.** La tiamina se usa en la industria alimentaría para restaurar su contenido inicial ya que en las harinas de panificación, el proceso destruye hasta 20% de la vitamina. Además por su inestabilidad alta a pH alcalino se recomienda agregarla a los productos ácidos, como sería el caso de cierto tipo de reposterías.

En muchos países como en México, el pan de caja es adicionado con vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina y sales minerales como sulfato ferroso(Vega, 2002).

**LECHE DESCREMADA O SEMIDESCREMADA.** Durante la elaboración de estos productos, se separa la grasa propia de la leche, por lo que con ello se

eliminan cantidades apreciables de vitaminas liposolubles como A y D, por ello la legislación sanitaria mexicana a través de la Norma Oficial mexicana NOM-091-SSA-1-1994, obliga al industrial, cuando la leche pasteurizada contenga un máximo de 16g/L, a su restauración con 2000 UI de vitamina A.

Por otro lado, el uso de alimentos como vehículos para hacer llegar al consumidor nutrimentos (adición) que originalmente no contenían se puede ejemplificar con el siguiente producto:

**SAL.** La sal de mesa es un vehículo ideal para la adición de yodo, debido a que es un alimento consumido por toda la población, además es posible calcular su consumo promedio. Por lo general para la yodación de la sal se utilizan dos formas químicas de yodo: el yoduro de potasio (KI) y el yodato de potasio (KIO<sub>3</sub>) que es más estable y resistente a la evaporación. Otras alternativas de adicionar yodo a los alimentos pueden ser: leche, chocolate, harina de trigo y alimentos infantiles (Vega, 2002).

### **1.2.5 FÓRMULA DE ALIMENTACIÓN ESPECIALIZADA**

Las fórmulas para la alimentación especializada son alimentos dietéticos con propósitos médicos especiales. Tienen justamente el objetivo de cubrir los requerimientos nutricionales particulares de las personas que desarrollan una necesidad especial o están desnutridas como consecuencia de una enfermedad, desorden o condición médica específica.

Las fórmulas de alimentación especializada se utilizan para la alimentación enteral, que se define como el método por el que se proveen nutrimentos al

tracto gastrointestinal a través de una sonda que puede ser colocada en diversos sitios del aparato digestivo o vía oral.

Resumiendo y considerando la información científica antes citada, los alimentos funcionales a diferencia de los nutracéuticos, los suplementos alimenticios, los alimentos adicionados y las fórmulas de alimentación especializada, se caracterizan por:

- Ser alimentos comunes semejantes en apariencia física a los alimentos convencionales.
- Aportar nutrimentos, pero además contener sustancias funcionales o microorganismos inocuos capaces de producir efectos metabólicos o fisiológicos demostrados.
- Se consumen como parte de la dieta diaria.
- Ser útiles para el mantenimiento de una buena salud física y mental.
- Son auxiliares en la reducción del riesgo de adquirir enfermedades crónicas y degenerativas (Vega, 2002).

### **1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES**

Actualmente existen muchos alimentos considerados como funcionales en el mundo. En el Cuadro 1 se presentan algunos ejemplos de componentes de alimentos funcionales.

Todos ellos se caracterizan por contener sustancias o microorganismos inocuos que se ha podido demostrar a través de métodos de laboratorio o epidemiológicos que podrían prevenir o pueden curar algunas enfermedades.

**Cuadro 1. Principales componentes funcionales**

<b>Origen</b>	<b>Clase/Componente</b>	<b>Beneficio Potencial</b>
	<b>Carotenoides</b>	
Zanahoria, Frutas, Vegetales verdes	Beta caroteno	Neutraliza los radicales libres que podrían dañar a las células.
Vegetales verdes	Luteína	Contribuye a una visión sana.
Tomate, pimientos rojos, toronja roja.	Licopeno	Podría reducir el riesgo de cáncer. Antioxidante.
	<b>Fibras dietéticas</b>	
Cáscara de trigo	Fibra insoluble	Podría reducir el riesgo de cáncer de colon. Reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares
Avena	Beta glucano	Reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular.
	<b>Ácidos grasos</b>	
Atún, pescado y aceites marinos.	Omega 3, ácido graso DHA	Podrían reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular y a mejorar funciones mentales y visuales.
Queso, productos cárnicos.	Ácido linoleico conjugado	Podrían mejorar la composición corporal, podrían reducir el riesgo de ciertos tipos de cánceres.
	<b>Flavonoides</b>	
Té	Catequizas	Neutraliza radicales libres, podría reducir el riesgo de cáncer.
Cítricos	Flaonas	Neutraliza radicales libres. Podría reducir el riesgo de cáncer.
	<b>Esteroles vegetales</b>	
Maíz, soya, trigo	Ester estanol	Reduce los niveles de colesterol sanguíneo.
	<b>Probióticos/Prebióticos</b>	
Yogurt y otros productos lácteos	Lactobacilos, Bifidobacterias	Podrían favorecer la función gastrointestinal y la producción de vitamina B <sub>12</sub> y vitamina K.
Achicoria, cebolla	Fructo-oligosacáridos	Podría mejorar la salud gastrointestinal. Control de glucosa en sangre.
	<b>Fitoestrógenos</b>	
Alimentos con soya	Isoflavonas	Prevenir cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, disminuye las molestias de la menopausia.
Uvas tintas Té verde	<b>Polifenoles (taninos-condensados)</b>	Prevenir cáncer por su capacidad antioxidante de eliminar radicales libres en el organismo.

Fuente: Alvidrez-Morales, 2002, Vasconcellos, 2000, Garduño, 2001.

El campo de acción de los alimentos funcionales puede ser dividido en 2 partes:

- Los que son usados para incrementar cierta función fisiológica.
- Los que se utilizan para reducir el riesgo de una enfermedad (Bass, 2000).

Los productos lácteos pueden ser vehículo de sustancias funcionales y microorganismos benéficos para la salud. En el siguiente cuadro se presenta ejemplos de la oferta de lácteos funcionales en el mercado Europeo.

**Cuadro 2. Alimentos funcionales lácteos de venta en Europa**

Ingrediente	Producto	País
Ácido fólico	Bebida láctea	Francia
Avena+ germen de avena+almidón + $\beta$ glucano	Leche fermentada	Finlandia
$\beta$ -caroteno	Yogur para niños	Bélgica
<i>Bifidobacterium</i>	Leche fermentada	La mayoría de los países
Calcio	Leche fermentada	Alemania, Francia Reino Unido
Fibra soluble	Yogur	Reino Unido
<i>L. casei</i>	Leche fermentada	Francia, Holanda, etc.
<i>L. acidophilus</i>	Leche fermentada	La mayoría de los países.
Mezcla de probióticos	Leche fermentada	Alemania, Austria, Dinamarca
Mezcla de prebiótico* + prebiótico	Bebida láctea	Holanda
Omega 3( aceite de pescado)	Pasta para untar	Reino Unido, Irlanda
Vitaminas + proteínas + minerales	Leche	Italia

\*Prebiótico: son hidratos de carbono que resisten la digestión en la parte superior del tracto gastrointestinal, no se absorben en cantidades significativas y son como consecuencia fermentados en el colon.

Fuente: Roberfroid, 1999.

## 1.4 PROBIÓTICOS

Los probióticos son, tal vez, el ejemplo mejor caracterizado y más estudiado de los alimentos funcionales. Se definen como alimentos que contienen microorganismos vivos, que al ser ingeridos en cantidades suficientes, ejerce un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales (Roberfroid, 1999; Ortega et al, 2002).

Fuller (1992) define a los probióticos como microorganismos vivos incorporados como suplementos a algunos alimentos para beneficiar la salud del huésped humano o animal a través de mejorar el balance de su flora intestinal.

La mayoría de los probióticos se hallan dentro del grupo de los organismos conocidos como bacterias productoras de ácido láctico (BAL), y se consumen normalmente en forma de yogur o leches fermentadas, aunque también se encuentran en el mercado preparados o cápsulas de organismos liofilizados (Ortega et al, 2002).

Los efectos beneficiosos atribuidos a los alimentos probióticos se dividen en las siguientes áreas con distintos grados de apoyo experimental:

- **Atenuación de la intolerancia a la lactosa.** Mal absorción de lactosa es una condición en la cual la lactosa, el principal hidrato de carbono de la leche, no es completamente digerido a sus componentes monosacáridos, glucosa y galactosa, la mala absorción resulta de la deficiencia de la enzima  $\beta$ -D- galactosidasa. Hay suficientes evidencias de que el yogur, y más específicamente los organismos

presentes en el yogur, atenúan los síntomas de la intolerancia a la lactosa en individuos deficientes en lactasa. El efecto beneficioso se debe principalmente a que las bacterias productoras del ácido láctico presentes en el yogur incrementa la actividad de la lactasa en el intestino delgado, y no tanto a los reducidos niveles de lactosa en el yogur (Nagendra et al, 2001; Ortega et al,2002).

- **Efectos preventivos y terapéuticos contra la diarrea.** Esta área es tal vez la más avalada por los estudios de intervención humana. Hay mayor evidencia de los efectos beneficiosos en niños con diarrea producida por rotavirus; así, diferentes estudios han demostrado que la duración de los síntomas de la enfermedad se reduce cuando se consumen ciertos lactobacilos. Junto a estos efectos sobre la diarrea, se observa un incremento en el nivel de inmunoglobulinas específicas para rotavirus, creando un mecanismo de defensa inmune que acompaña al efecto antidiarreico. En adultos se ha observado la reducción de la diarrea asociada con tratamientos antibióticos, tras el consumo de probióticos. Un área relacionada donde, por ahora, la evidencia se muestra inconsistente en cuanto a efectos beneficiosos preventivos es en la diarrea del viajero. Se ha demostrado la efectividad de los probióticos para el tratamiento de la diarrea aguda y crónica, esto debido más que nada a una normalización de la flora intestinal y erradicación de bacterias nocivas, (coliformes, por ejemplo) (Nagendra et al, 2001; Ortega et al,2002).

- **Efectos sobre el sistema inmunológico.** Estudios de intervención humana con probióticos han aportado evidencia de la modulación del sistema inmunológico al incrementar los niveles de células secretoras de anticuerpos. Estimula la producción de citocinas (interferón  $\gamma$ ) por linfocitos, proliferación de células B y NK, anticuerpos IgM e IgG y actividad fagocítica de leucocitos. Por ahora, es difícil interpretar las implicaciones de estos cambios para la salud humana. (Milke, 2000; Nagendra et al, 2001; Ortega et al, 2002)
  
- **Reducción del colesterol plasmático.** Ha resultado tentador para algunas compañías fabricantes de productos lácteos la posibilidad de que el yogur y otros probióticos redujesen el colesterol plasmático. Hasta la fecha, sin embargo, no hay evidencia concluyente de tal actividad. Los estudios en animales con BAL de alta actividad hidrolítica de las sales biliares han indicado efectos muy modestos en la reducción del colesterol (Ortega et al, 2002; [www.fao.org](http://www.fao.org)).
  
- **Disminución en la síntesis de sustancias de putrefacción,** nocivas para el organismo (amonio, fenoles, ácido sulfhídrico, metabolitos de triptofano y tirosina, indoxil sulfato, p-cresol) (Milke, 2000).
  
- **Enfermedad intestinal inflamatoria.** La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son enfermedades inflamatorias crónicas del intestino delgado y grueso, difíciles de tratar con éxito con medicamentos, siendo comunes las recaídas. Hay evidencias que muestran que los probióticos mejoran dichas enfermedades (Ortega et al, 2002).

- **Prevención del cáncer.** Se ha postulado que el consumo de probióticos podría prevenir el cáncer de colon basándose en que los probióticos pueden alterar la microflora colónica, la cual juega un papel importante en la etiología del cáncer. Hasta ahora, sólo se han realizado estudios con animales para respaldar esta teoría, aunque tales estudios son muy sugerentes respecto a un efecto protector. Los estudios epidemiológicos recientes aportan evidencia de que el consumo de yogur puede reducir el riesgo de sufrir cáncer de colon, aunque se carece de la evidencia definitiva (Ortega et al, 2002; [www.fao.org](http://www.fao.org)).
- **Alergias.** Se ha sugerido que las características inmunomoduladoras de (BAL) podría ser utilizado en patologías humanas en las que está implicado el sistema inmune. En concreto, en relación con las enfermedades alérgicas, numerosos estudios de laboratorio y de experimentación clínica demuestran ciertos efectos de los probióticos para dificultar o impedir el desarrollo del mecanismo alérgico, para prevenir o minimizar la aparición de alergopatías. Hasta el momento los resultados son controvertidos y no se conocen los mecanismos de acción (De las Cagigas, 2001; [www.fao.org](http://www.fao.org)).

La información antes citada se presenta y completa en el cuadro 3.

**Cuadro 3. Efectos relacionados con la salud que se atribuyen a los probióticos utilizados en leches fermentadas.**

Tipo	Beneficios en la salud	Beneficios comprobados en la salud en humanos.(1)
Efectos fisiológicos	<p>Cepas resistentes al pH biliar, actividad enzimática.</p> <p>Producción de bacteriocinas,</p> <p>Mejoramiento de la digestión.</p> <p>Efecto antagonista contra <i>Helicobacter pylori</i>.</p>	
Acción del tracto digestivo	<p>Mejoramiento de la digestión de lactosa en personas con deficiencia de lactasa.</p> <p>Prevención de los disturbios intestinales.</p> <p>Adhesión a los cultivos de la línea celular intestinal humana.</p> <p>Estimulación de la inmunidad intestinal en modelos animales.</p> <p>Estabilización de la enfermedad de Crohn.</p>	
Alteración de la microflora intestinal	<p>Regulación de la motilidad intestinal.</p> <p>Equilibrio de las poblaciones de bacterias intestinales.</p> <p>Aumento de las bifidobacterias fecales.</p> <p>Disminución en las actividades de las enzimas fecales.</p> <p>Disminución de la mutagenicidad fecal.</p> <p>Colonización del tracto intestinal</p>	<p>Aumento de las bifidobacterias fecales.</p> <p>Disminución en las actividades de las enzimas fecales.</p> <p>Alivio de los síntomas de la intolerancia a la lactosa.</p>

Acción sobre la diarrea	<p>Prevención y/o tratamiento de la diarrea aguda.</p> <p>Prevención y/o tratamiento de la diarrea por rotavirus.</p> <p>Prevención de la diarrea asociada a los antibióticos.</p> <p>Tratamiento de la diarrea recurrente por <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>Tratamiento de la diarrea persistente.</p>	<p>Acortamiento de la diarrea por rotavirus.</p> <p>Tratamiento de la diarrea persistente en niños.</p>
Efectos sistémicos	<p>Estimulación de la actividad fagocítica.</p> <p>Estimulación de la producción de interferón en las células sanguíneas mononucleares humanas en cultivos.</p> <p>Reducción de la hipertensión en modelos animales y en humanos.</p> <p>Efectos benéficos en el cáncer superficial de la vejiga.</p> <p>Alivio de los síntomas clínicos de la dermatitis atópica en niños.</p>	

(1) Más de una publicación sin datos controversiales en humanos.

Fuente: Saloff-Coste, 1997

## CAPÍTULO II

# MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

## CAPÍTULO II

### MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES.

Un factor clave en el desarrollo de la industria de los alimentos funcionales es la aceptación del público consumidor de tales alimentos, para ello se necesita que los consumidores estén convencidos de los beneficios a la salud que le brindan tales productos. Es claro que la industria de alimentos debe evitar etiquetar en esta categoría cualquier producto sin la previa validación de beneficio a la salud y los organismos reguladores sólo deben permitir el uso de declaraciones de salud cuando este debidamente validado su efecto positivo. En ese sentido, es donde los sectores académicos y de investigación deben participar en el proceso de evaluar y autenticar el beneficio a la salud del alimento para que tal etiquetado sea imparcial y fidedigno. Esta evaluación debe abarcar el estudio de las funciones orgánicas afectadas por el alimento y/o ingrediente funcional, incluyendo su papel en el mantenimiento de la salud o en la prevención de enfermedades, la identificación y validación de los biomarcadores, así como estudios de causa-efecto donde se evalúe la seguridad y la dosis (Alvídrez, 2002).

Esto favorece el surgimiento de un nuevo campo de investigación en donde especialistas en nutrición y en ciencia y tecnología de alimentos trabajen activamente analizando los productos que se venden actualmente con supuestos beneficios a la salud, así como en la formulación de nuevos productos que permitan vislumbrar un futuro promisorio para la salud de la humanidad (Alvídrez, 2002).

La justificación científica de la mejora de una función (por ejemplo, el aumento de la densidad ósea) o de la reducción de uno de los factores de riesgo de una enfermedad debe basarse en todos los datos disponibles y, obligatoriamente, en los resultados de estudios llevados a la población humana, a quien está destinado el alimento.

Los probióticos deben ser considerados como alimentos y no como medicamentos. Sin embargo, para demostrar la eficacia en términos de salud humana, el acercamiento metodológico debe ser similares que usaron para los medicamentos (Adeberth, 1998).

La primera meta es establecer el efecto de salud de un producto dado que tiene presente la cepa, las condiciones de cultivo industriales y el producto final que se darán al consumidor. Para demostrar semejante efecto, los acercamientos metodológicos buenos son aquellos usados para los medicamentos e incluyen experimentos doble ciego contra un placebo en humanos. La acción específica de productos probióticos debe ser considerada para los estudios farmacológicos (Adeberth, 1998).

## **2.1 CONDICIONES QUE DEBE REUNIR UN ALIMENTO PARA SER CONSIDERADO FUNCIONAL**

La condición es la presentación de bases científicas sólidamente establecidas, según el ILSI los primeros pasos que hay que llevar a cabo son los siguientes:

- Identificar la interacción existente entre los componentes funcionales y algunas funciones específicas en el organismo, y obtener pruebas sobre los mecanismos que regulan dichas interacciones;
- Identificar y aprobar marcadores que sean sensibles a la modificación de las funciones a través de factores alimentarios;
- Evaluar la seguridad de la cantidad de alimento o nutrientes necesarios para producir un efecto funcional. El trabajo que se ha de realizar en torno a los marcadores constituye una de las prioridades establecidas (Roberfroid, 1999).

Los investigadores necesitan disponer de marcadores que sustituyan de forma adecuada estudios largos, amplios y estadísticamente válidos sobre el efecto de un nutrimento en la mejora de una función fisiológica, en la mejora de la salud y/o en la reducción de los factores de riesgo de determinadas patologías.

Un marcador es un elemento mensurable que refleja la interacción entre un sistema biológico determinado y un agente del medio ambiente, incluidos los elementos procedentes de la alimentación; a su vez, dicha interacción modifica un compuesto bioquímico o celular de un proceso, de una estructura o de una función.

Los marcadores deben ser fácilmente accesibles y, en la medida de lo posible, no invasivos. Su medición debe ser fácil y fiable; deben estar directamente vinculada a la enfermedad y ser sensibles, específicos y

reproducibles. Los marcadores pueden usarse solos o en grupos (Beaufrére, 2003).

## 2.2 TIPOS DE MARCADORES

En virtud de las necesidades específicas de los estudios alimentarios, se recurre a tres tipos de marcadores, que a continuación se explican:

- Marcadores de exposición al componente alimentario estudiado, por ejemplo, el aumento de los folatos de los glóbulos rojos como indicador de la ingestión de folatos; para evaluar de manera más general, la biodisponibilidad.
- Marcadores de funciones objetivo y de respuestas biológicas, tales como las modificaciones a nivel de los fluidos corporales o de los tejidos de un metabolito, de una proteína, de una enzima o un cambio de nivel de una función dada, como la fuerza muscular o la duración del tránsito intestinal.
- Marcadores de fases intermedias, que indican la mejora del estado de salud o de bienestar y/o la reducción del riesgo de una enfermedad; por ejemplo, la medida de un proceso biológico directamente vinculado a la mejora o a la enfermedad (Roberfröid, 1999; Beaufrére, 2003).

### 2.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES

Los marcadores pueden ser fisiológicos, bioquímicos o de comportamiento.

Pero deben en todos los casos, presentar las características siguientes:

**Prácticos:** especialmente en términos de duración.

**Válidos:** deben corresponder a los procedimientos de control estándar.

**Reproducibles:** deben estar claramente vinculados a los fenómenos estudiados y poder reproducirse en distintos centros.

**Sensibles:** la frecuencia de un resultado negativo en presencia del fenómeno debe ser baja y estar perfectamente determinada.

**Específicos:** la frecuencia de un resultado positivo en ausencia del fenómeno debe ser baja y estar perfectamente determinada.

**Éticos:** y lo menos invasivos posible (Roberfroid, 1999; Beaufrère, 2003).

Los estudios en el campo de la nutrición recogen la labor de investigación llevada a cabo en numerosos ámbitos: la química analítica (por ejemplo, contenidos y factores de variación de los fitoconstituyentes), las encuestas de consumo (que alimentos corresponden a cada tipo de consumidores), epidemiología (relación entre alimentación y salud teniendo en cuenta un papel representativo de la población), la bioquímica (puesta a punto de marcadores, modelos celulares y animales), etc. Es necesario convalidar en el hombre el haz de pruebas procedentes de todas estas especialidades, por medio de investigaciones clínicas.

## 2.3 DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS

### La sustancia bioactiva

La sustancia bioactiva en un alimento, a menudo se trata de un conjunto de sustancias, la sustancia es incierta o su concentración varía en función del procesamiento aplicado al alimento, del grado de madurez del alimento, del plazo de conservación, etc. (Beaufrére, 2003).

En el caso de los alimentos, a menudo las sustancias existen en el organismo, lo que implica el desarrollo de métodos particulares para poder rastrear específicamente lo que proviene del alimento. En ocasiones, la composición del alimento y de la comida modula el efecto de la sustancia, por medio del juego de sustancias sinérgicas o antagonistas.

En algún caso específico, no existe una fuente única de la sustancia estudiada en la alimentación: por ejemplo, el calcio aportado por los productos lácteos, las bebidas, etc.

A pesar de la dificultad de evaluación de las interacciones y de los acontecimientos metabólicos que suceden, existe una fuerte presión reglamentaria para presentar una explicación mecánica sobre el efecto de la sustancia estudiada (Beaufrére, 2003).

## 2.4 ENSAYOS CLÍNICOS

Los estudios con la participación de humanos o ensayos clínicos son considerados como la prueba final científica para las afirmaciones sobre la salud.

Dichos estudios deberán cumplir con los requisitos siguientes:

- Estar basados en evidencia científica
- Incluir estudios con humanos
- Tratar con productos no ingredientes
- Contener datos reproducibles
- Ser pertinente para el grupo objetivo y,
- Ser coherentes con normas nutricionales.

El marco de estos estudios está vinculado al estado de adelanto de la investigación científica, determinando por tanto en gran medida la elección del tipo de estudio y de los criterios de evaluación (Bass, 2000).

Se debe intentar definir la cantidad óptima de individuos que participan en el estudio: un número bajo comprometería la pertinencia de los resultados, mientras que un número demasiado elevado no se justificaría en el plano científico, sería discutible en el plano ético y aumentaría inútilmente los costos.

La gran mayoría de las investigaciones se hace de forma aleatoria; para garantizar que el efecto observado no es producto del azar, los individuos estudiados se distribuyen aleatoria mente en distintos grupos. En algunos

casos no es posible aplicar aleatoriedad. En pruebas clínicas, el estándar es el doble-ciego, placebo controlado.

En el caso de los estudios doble ciego, tanto los individuos como los experimentadores ignoran cuál es el producto que se pone a prueba y cuál es el de control. En los estudios ciego simple se trata, en general, de individuos que ignoran cuál es el producto que se les administra (Bass, 2000; Beaufrère, 2003).

En los estudios paralelos, sólo se somete a prueba un producto en cada grupo de individuos; este tipo de estudios limita el efecto "periodo". En los estudios cruzados cada grupo de individuos prueba primero un producto y luego el otro; este tipo de estudios minimiza el efecto "sujeto".

Algunos pocos estudios incluyen un único grupo de individuos, en los cuales se compara un mismo criterio antes y después de la administración de un producto, en cuyo caso cada individuo es su propio control (Beaufrère, 2003).

La epidemiología nutricional tiene por objeto el estudio de las coincidencias entre determinados factores alimentarios y la aparición de patologías, en el entorno natural de los individuos.

#### 2.4.1 ENSAYOS CLÍNICOS REALIZADOS CON PROBIÓTICOS

En las tablas 4, 5 y 6 se presenta información sobre diversos estudios clínicos que se han realizado con microorganismos considerados como probióticos como *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacterias y *Lactobacillus casei*. Puede observarse que los ensayos se han realizado en humanos, como en animales y en células cultivadas en laboratorio; el tipo de efecto observado y alimento usado.

**Cuadro 4. Ensayos clínicos con *L. acidophilus***

Organismo	Prueba	Efecto	Control	Forma
<i>Lacidophilus</i>	<i>In vivo</i> (30 humanos) con hipercolesterolemia	Disminución en el colesterol sérico total, colesterol LDL, relación LDL/HDL	Aleatorio, placebo-controlado	Yogur
<i>Lacidophilus</i> , <i>B.bifidum</i>	<i>In vivo</i> (20 humanos)	Restauración parcial de la microflora intestinal	Doble-ciego, placebo	Capsulas
<i>Lacidophilus</i>	<i>In vivo</i> (ratones suizos albinos)	Aumento de células productoras de IgA e IGG.	Leche sin grasa estéril	Yogurt

Fuente: Saloff-Coste, 1997.

**Cuadro 5. Ensayos clínicos con Bifidobacterias**

Organismo	Prueba	Efecto	Control	Forma
<i>B.breve</i> 4064	<i>In vitro</i>	Aumento Secretor IgA	<i>B.breve</i> Ka-6	-
<i>B.longum</i> BL 2928	<i>In vitro</i>	aumento Producción de IL-1	latex	Liofilizado
<i>B.bifidum</i> y <i>L.acidophilus</i>	<i>In vivo</i> (15 humanos)	Disminución inflamación crónica del colón	Placebo	Liofilizado
<i>B.longum</i> BB536	<i>In vivo</i> (48 humanos)	Disminución en la Población de clostridia. Disminución en la Población de bacteroides. Disminución en la población de coliformes.	<i>B.longum</i> ATCC15707	Leches fermentadas.
<i>Bifidobacterium Spp.</i>	<i>In vivo</i> (humanos)	Sobrevive durante el tránsito intestinal	-	Leches fermentadas
<i>Bifidobacterium</i>	<i>In Vitro</i>	Inhibición de nitritos y nitrosaminas	-	Leches fermentadas

Fuente: Saloff-Coste, 1994; 1998.

**Cuadro 6. Ensayos clínicos con *L. casei***

Organismo	Prueba	Efecto	Control	Forma
<i>L.casei</i>	<i>In vivo</i> (39 niños)	incremento de IgA, IgG, IgM,	Placebo	Leche fermentada
<i>L.casei</i>	<i>In vivo</i> (71 niños)	disminución en duración de diarrea por rotavirus	Placebo	Leche Fermentada o Liofilizada

Fuente: Saloff-Coste, 1995

CAPÍTULO III  
PROBIÓTICOS

## CAPÍTULO III

### PROBIÓTICOS

#### 3.1 ANTECEDENTES

Los probióticos son microorganismos que estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo. Para ello es necesario que estas bacterias lleguen y permanezcan vivas en el tracto gastrointestinal (De las Cagigas, 2001).

Para entender el mecanismo de acción de los probióticos, es importante comprender la microbiología y la fisiología del tracto gastrointestinal humano.

El intestino humano constituye el hábitat natural de un buen número de bacterias, que han evolucionado y se han adaptado al ecosistema intestinal desde hace milenios. Este ecosistema se conoce como "flora intestinal" pero también se utiliza el término de "microbiota", que se define como la colectividad de comunidades microbianas que pueblan las superficies mucosas (Ortega et al, 2002).

Un microorganismo prebiótico tiene que poseer características tales como: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución del alimento que los

contenga para que pueda estar vivo en el intestino. Es importante que estos microorganismos puedan ser capaces de atravesar la barrera gástrica para poder multiplicarse y colonizar el intestino (De las Cagigas, 2001).

Se conocen en todo el mundo más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos en humanos. La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y son utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados (41). La mayoría de los productos probióticos contienen bacterias del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, sin embargo otros géneros incluyendo *Enterococcus*, *Escherichia*, *Bacillus* y *Saccharomyces* (una levadura) han sido marcados como probióticos ([www.usprobiotics.org](http://www.usprobiotics.org)).

Las bacterias ácido-lácticas mediante la fermentación utilizan varios azúcares como la glucosa y la lactosa para la producción de ácido acético. Algunas bacterias conocidas como anaerobias facultativas y otras como anaeróbicas obligadas, pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal, además por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del huésped (De las Cagigas, 2001).

Las bacterias probióticas son usualmente seleccionadas de bacterias que normalmente habitan en el sistema gastrointestinal y pertenecen a especies que son conocidas como inofensivas. Estas bacterias son purificadas, crecen en grandes cantidades, concentradas a dosis altas y conservadas ([www.usprobiotics.com](http://www.usprobiotics.com)).

Un probiótico puede ser usado exógenamente o endógenamente para realizar una categoría nutricional y /o la salud del hospedero. En el caso de uso exógeno estos microorganismos son usados comúnmente para fermentar varios alimentos, por este proceso pueden preservar y hacer sus nutrimentos más biodisponibles. En el caso de uso endógeno es la producción de sustancias que pueden ser antibióticos, anticancerígenas o tener otras propiedades farmacéuticas (Fuller, 1992)).

Leches o productos lácteos son portadores excelentes de estos organismos probióticos. La mayoría puede utilizar lactosa como fuente de energía durante la fermentación y ganar energía para el crecimiento. Así, un requerimiento importante para el crecimiento en el tracto intestinal es proporcionado por la leche. Algunos de ellos, están estrechamente relacionados, se han usado durante siglos en el fabricación de productos lácteos, por esta razón, están generalmente considerados como seguros, lo cual significa que no hay ninguna objeción de ser usados como adjuntos dietéticos en producto lácteos (Stanley, 2000).

Mientras los cultivos iniciadores tradicionales usados en la industria láctea se seleccionan por su habilidad de exaltar calidades sensoriales deseables en los productos, las bacterias probióticas deben ser seleccionadas por el potencial de suministrar beneficios a la salud específicos o nutricionales seguidos a su consumo (Stanley, 2000).

### 3.2 BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LOS PROBIÓTICOS

Desde la antigüedad se han atribuido propiedades benéficas a la presencia de microorganismos vivos en los alimentos. Ya en el libro del Génesis se atribuye la longevidad de Abraham al consumo de leche acidificada. El historiador Plino (76 a C) recomendaba el consumo de productos lácteos fermentados para el tratamiento de la gastroenteritis.

A partir del desarrollo de la microbiología, diferentes investigadores como Carre, Tissier o Metchnikoff atribuyeron estos efectos benéficos a modificaciones inducidas por los componentes de estos alimentos en la composición de la flora intestinal (Ortega et al, 2002).

Ilya Metchnikoff, Premio Nobel de Medicina en 1908, consideraba fundamental la sociabilidad de las bacterias intestinales con su huésped. Las putrefactivas producirían residuos tóxicos y las fermentativas impedirían su desarrollo, reduciendo su toxicidad. Precisamente en países de gran longevidad, como Bulgaria, la característica general es un elevado consumo de yogur. De esta manera pasó a considerar lo que llamó "bacilo búlgaro" como un medio de evitar enfermedades degenerativas y de prolongar la vida. Tissier recomendaba la administración de bifidobacterias a los lactantes con diarrea y demostró que las bifidobacterias eran la flora predominante en los niños que recibían lactancia materna (Ortega et al, 2002).

En 1935 Rettger demostró que el bacilo búlgaro no se multiplica en el interior del intestino, y por esto debe ser ingerido de forma constante, y

reveló que la acidificación intestinal suprime el crecimiento de otros patógenos, enfatizando sus aspectos terapéuticos. Fuller en 1989 y posteriormente Guarner y Schaafsma llegaron a la definición de probiótico.

El concepto de probiótico, del griego "a favor de la vida", fue acuñado en 1965 por Lilly y Stillwell para designar al factor o factores producidos por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos. Parker en 1974 fue el primero en utilizar el término probiótico en el mismo sentido que hoy se utiliza (Ortega et al, 2002).

Más adelante, en 1992, Havenaar y Huis in't Veld ampliaron el concepto, sugiriendo que estos productos proceden de cultivos mixtos o simples de microorganismos vivos que, aplicados al hombre o a los animales, afectan beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la microflora, deben sobrevivir en las condiciones ambientales de la zona donde tienen que ser activos, proliferar y/o colonizar dicha zona, no deben ser patógenos, tóxicos, alergénicos, mutagénicos o carcinogénicos, ni en sí mismos ni por sus productos de fermentación o componentes celulares, deben ser genéticamente estables, no transferir plásmidos, de fácil producción y reproducible, así como viables durante el procesamiento y conservación de alimentos. Schaafsma (1996) amplía todavía más la definición y no limita los efectos beneficiosos a la acción de los probióticos sobre la flora intestinal, sino que afirma que tienen un efecto benéfico sobre la salud y la nutrición del huésped, aunque circunscribe al término a cultivos lácteos (Ortega et al, 2002).

Recientemente, Schrezenmeir y Vrese (2001) sugieren una revisión del concepto de probiótico, refiriéndose a un preparado o un producto (lácteo o no que contiene microorganismos definidos viables en cantidad suficiente, que modifica la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped y por este medio ejerce efectos benéficos sobre su salud.

Aunque el concepto de probiótico fue introducido a principio del siglo XX, el término no fue creado hasta el año 1960. La definición del término ha ido evolucionando a través de los años (ver cuadro 7). La definición más apropiada publicada por la FAO "son microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en cantidades adecuadas confiere beneficios en la salud del huésped".

Esta definición tiene las siguientes características:

- Los probióticos deben estar vivos; aunque esta reconocido que células muertas pueden transmitir beneficios fisiológicos.
- Los probióticos deben expresar un beneficio fisiológico medido, justificado por estudios conducidos en el huésped objetivo.
- Los probióticos no necesitan ser restringidos sólo para aplicaciones alimentarias, si se usan como agentes farmacéuticos no están excluidos de esta definición.
- La definición de probióticos no debe limitar el mecanismo de acción, por lo tanto, la supervivencia del tracto gastrointestinal ó impacto sobre la flora no deberán ser requeridos ([www.usprobiotics.org](http://www.usprobiotics.org)).

**Cuadro 7. Definiciones Publicadas de Probióticos**

Definición Publicada	Referencia
Substancias producidas por microorganismos los cuales estimulan el crecimiento de otros microorganismos.	Lilly y Stillwell,1965
Organismos o sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal.	Parker,1974
Un suplemento de organismos vivos los cuales benefician al huésped animal mejorando su balance microbiano intestinal.	Fuller,1989
Un cultivo mono o mixto viable de microorganismos los cuales aplicados a un animal o a la especie humana afectan beneficiosamente al huésped por mejoramiento de las propiedades de la microflora endógena.	Havenaar y Huis In't Veld,1992
Organismos vivos los cuales ingeridos sobre cierto número ejercen un efecto saludable más allá de lo inherente a la nutrición básica.	Schaafsma,1996
Un auxiliar dietético microbiano que afecta beneficiosamente la fisiología del huésped modulando la inmunidad sistémica, así como mejorando el equilibrio nutritivo y microbiano en el tracto intestinal.	Naidu et al.1999
Una preparación ó producto que contiene microorganismos viables, definidos en números suficientes que alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped y por este medio ejerce efectos benéficos en la salud del huésped.	Schrezenmeir y De Vrese,2001
Microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confiera un beneficio en la salud del huésped.	FAO/WHO,2001

Fuente: De las Cagigas, 2001, [www.mesanders.com](http://www.mesanders.com), Scher ezenmeir, 2001

### 3.3 COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA MICROFLORA GASTROINTESTINAL EN EL ADULTO

La microflora intestinal es un rico ecosistema compuesto por microorganismos metabólicamente activos que colonizan la mucosa intestinal. Los sustratos para la transformación bacteriana pueden llegar a la flora

colónica a través de la ingestión de alimentos, secreción biliar o secreción a través de la mucosa intestinal (Milke, 2000).

La Figura 2 muestra la distribución de las principales especies bacterianas en el tracto digestivo humano. Todos los microorganismos se originan de la ingestión a través de la boca o de la nariz; noventa y nueve por ciento de las bacterias son anaerobias. Normalmente, el estómago contiene muy pocas bacterias residentes (menos de  $10^3$  unidades formadoras de colonias (UFC/ mL) debido al pH bajo de alrededor de 2; pero experimenta un flujo constante de microorganismos en tránsito que provienen de la boca y la nariz, tanto del medio ambiente como de los alimentos y bebidas que se ingieren. El intestino delgado superior también contiene relativamente pocos microorganismos, con hasta  $10^5$  UFC/mL. En el intestino delgado, los movimientos peristálticos (olas sucesivas de contracciones a lo largo de las paredes, que empujan el alimento a través del tracto intestinal) empujan también a las bacterias y previenen su proliferación en esta región (Saloff-Coste, 1997; Bourlioux, 1998).

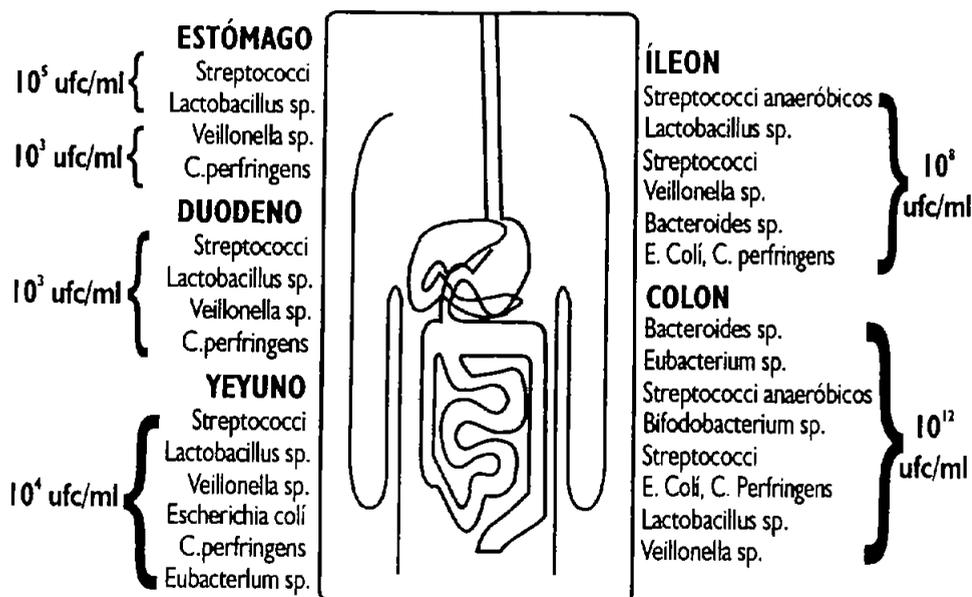
Mientras uno se aproxima al intestino delgado inferior, se incrementa el número de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, anaerobias estrictas o no. En el íleon distal, predominan los anaerobios Gram negativos, y cruzando hacia el colon, el número y variedad de anaerobios estrictos se incrementa dramáticamente.

El colon es un medio ambiente muy abundante, con casi  $10^{11}$  células viables por gramo de heces fecales frescas (un reflejo de la microflora del colon descendente). Existen ciertas diferencias entre las diversas secciones del colon, ya que el colon proximal tiene acceso a mayor cantidad de nutrimentos y,

por lo tanto, es metabólicamente más activo que el colon distal. Aunque los seres humanos tienen en común un patrón de composición general, todos los individuos tienen su propia microflora característica. En la Figura 2, solo se listan aquellas bacterias en cantidades mayores, como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria* y *Eubacterium spp.* Las especies con concentraciones de  $10^8 - 10^{11}/g$  se consideran "dominantes", mientras que las especies "subdominantes" se refieren a aquellas con  $10^6 - 10^8$  bacterias/g.

Figura 2

### Variación de las poblaciones y especies bacteriales a lo largo del tracto gastrointestinal humano en adultos en condición de no ayuno



Fuente: [www.danone.com.mx](http://www.danone.com.mx)

Existen cientos de especies subdominantes, a veces desconocidas, algunas de las cuales también pueden ejercer efectos específicos en el colon (Saloff-Coste, 1997; Bourlioux, 1998).

### 3.3.1 FUNCIONES DE LA MICROFLORA DEL COLON NORMAL

Al discutir las funciones de la microflora intestinal, es esencial comprender que las actividades de las bacterias, así como su composición (género, especie) y la cantidad involucradas son importantes, ya que "son *las actividades* de la microflora del colon lo que afecta a la fisiología sistémica y del colon y no las bacterias en sí". Las paredes celulares bacterianas también pueden interactuar con las células del huésped, como en el caso del sistema inmunológico.

Existen tres funciones fundamentales de la microflora del colon: metabólica (descomposición de los alimentos), de barrera, e interacciones con el huésped (por ejemplo, con el sistema inmunológico). Debido a que el colon aloja la mayor cantidad de bacterias, es muy activo metabólicamente. Las bacterias no son responsables de una función aislada, más bien, interactúan con otras bacterias de manera sinérgica, y están involucradas en una cascada de acciones. Sus actividades pueden conducir tanto a efectos benéficos como perjudiciales (Saloff-Coste, 1997; Bourlioux, 1998).

La flora intestinal es la principal responsable del proceso de fermentación que se lleva a cabo en el colon del hombre. El proceso de fermentación consiste en la transformación de sustratos en derivados más simples, con ayuda de las bacterias intestinales y la característica liberación de gas como parte del proceso (Torres, 2002).

Los sustratos usados para la fermentación intestinal se derivan de fuentes exógenas en su mayoría (dieta) y en una parte muy pequeña, de fuentes endógenas (productos derivados de la descamación del intestino).

La diversidad de bacterias permite la descomposición, fundamentalmente, de todos los sustratos que entran al colon. La degradación de los sustratos no digeridos por la microflora, particularmente de los hidratos de carbono dietéticos (por ejemplo, fibra, almidón resistente, azúcares no absorbidos y de las sustancias endógenas tales como moco, conducen a la producción de gases ( $H_2$ ,  $O_2$ ,  $CH_4$ ), ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (aproximadamente 60% de acetato, 20% de propionato y 20% de butirato) (Torres, 2002).

Los productos de la degradación tienen funciones nutritivas, como es el caso de los AGCC, especialmente el butirato y el ácido láctico, que sirven como sustratos de energía para los colonocitos, las células hepáticas, y los tejidos periféricos. Las bacterias del colon también están involucradas en la producción de diversas vitaminas tales como la vitamina K y algunas vitaminas del complejo B, aunque su utilización es variable; y pueden tener un papel en el metabolismo de los ácidos biliares primarios y del colesterol.

La obtención de los productos mencionados a partir del proceso de fermentación depende de dos factores: de la composición de la flora intestinal presente y de la composición de la dieta, que es donde provienen la mayor parte de los sustratos que se utilizan por la flora intestinal (Torres, 2002).

La flora residente en el tubo digestivo protege de la invasión de microorganismos patógenos por el llamado "efecto barrera". El efecto barrera es consecuencia del hecho de que la flora residente ocupa los nichos ecológicos accesibles, y administra, consume y agota todos los recursos. Además, las bacterias producen sustancias tales como las bacteriocinas y el peróxido de hidrógeno, que inhiben a otras bacterias; también producen metabolitos bacterianos tales como los ácidos acético y láctico, que ayudan a inhibir la proliferación bacteriana (Saloff-Coste, 1997).

La microflora normal tiene un papel importante en el desarrollo y la homeostasis del sistema inmunológico intestinal. Se espera investigar más esta función utilizando biomarcadores validados.

### **3.3.2 EVOLUCIÓN DE LA MICROFLORA INTESTINAL CON LA EDAD**

El ser humano permanece en el útero materno un periodo equivalente al 1% de su existencia. En el útero, el feto se encuentra protegido de la invasión bacteriana por los mecanismos de defensa de la madre ya que su sistema inmune se encuentra poco desarrollado. El desarrollo normal del feto solo se logra en un ambiente completamente libre de gérmenes en el interior del útero (Rivero, 2000).

En el momento del nacimiento, las bacterias comienzan a proliferar en la mucosa de la piel y en los aparatos respiratorios y digestivo. El contenido intestinal del recién nacido, el cual es expulsado como meconio, es una masa pegajosa, verde-café o negra la cual al microscopio se observa libre de bacterias.

En las horas siguientes al nacimiento, el tracto gastrointestinal del recién nacido, previamente estéril, adquiere un balance equitativo entre bacterias aerobias y anaerobias. Aunque la microflora se deriva de la madre, no es un réplica exacta; contiene las bacterias apropiadas para el bebé, y consiste principalmente de *Enterococá*, *E. coli*, *Bifidobacterium* y bacteroides. El tipo de alimentación influye significativamente el desarrollo de la microflora, particularmente de la del colon. La microflora es menos compleja que la de los adultos, es más sensible a su medio ambiente y tiene tendencia a fluctuar. En los infantes exclusivamente alimentados con pecho, las condiciones generalmente favorecen el crecimiento y dominio de bifidobacterias, aunque también pueden existir niveles altos de bacteroides. Además, la enterobacteria primordial es *Escherichia coli*, mientras que las enterobacterias son más variadas en los infantes que se alimentan con fórmulas (Saloff-Coste, 1997).

La alimentación con leche humana al recién nacido da mayor protección contra las enfermedades diarreicas, especialmente en los países en vías de desarrollo; este efecto positivo puede relacionarse en parte a los niveles de bifidobacteria. Entre los infantes que se alimentan con fórmulas, existe una tendencia al incremento de otros anaerobios, tales como bacteroides, pero también existen grandes diferencias individuales, y pueden predominar las bifidobacterias. Cuando la comida se introduce en la dieta, la microflora intestinal se hace más compleja y diversificada. A los dos años de edad, la composición y el metabolismo de la microflora del niño se parecen en muchos aspectos a aquella de los adultos y es más estable (Saloff-Coste, 1997).

Mientras que la composición básica es específica a la especie humana, existen diferencias individuales significativas entre las especies y números de

bacterias. Sin embargo, aunque en general la flora adulta es relativamente estable, las cepas específicas tienden a variar en algunos individuos. El estudio de la micro ecología de la flora requiere de técnicas sofisticadas, y es un avance reciente en su investigación. Aunque la flora se mantenga estable, sus funciones se pueden modificar a través de cambios transitorios en la composición.

Los cambios característicos en la composición y el funcionamiento de la microflora pueden ocurrir con la edad, pero este concepto es actualmente especulativo. En las personas de edad avanzada, se incrementa el riesgo de la disminución en la producción de jugo gástrico (hipocloridria), y esta condición puede conducir a un crecimiento exagerado de bacterias en el estómago y el intestino delgado (Saloff-Coste, 1997).

### 3.3.3 FACTORES QUE AFECTAN A LA MICROFLORA INTESTINAL

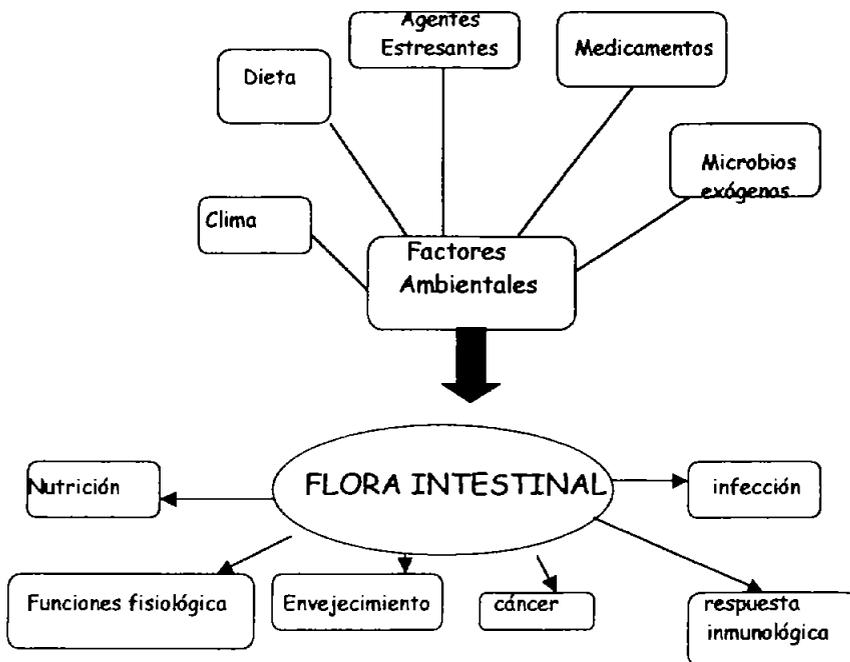
Una gran variedad de factores que se relacionan con el huésped, las bacterias y el medio ambiente, ayudan a mantener la composición y el funcionamiento adecuado de la microflora (ver figura 3); la desestabilización de cualquiera de estos elementos puede conducir a un crecimiento exagerado de bacterias y a problemas en la salud del huésped (se deben considerar los mismos factores al seleccionar los prebióticos potenciales).

El pH extremadamente bajo del estómago humano actúa como una barrera y previene la colonización de las bacterias que provienen de la boca; la mayoría de las bacterias son incapaces de sobrevivir a la acidez gástrica. En el intestino delgado, los cambios en los ácidos biliares o en el peristaltismo pueden cambiar los niveles de bacterias normalmente bajos. En el colon, donde existe una

abundancia de bacterias, la competencia por el espacio y los nutrimentos ayudan a mantener la integridad de la microflora (Saloff-Coste, 1997).

Aún cuando la composición de la flora intestinal es bastante estable en individuos saludables se puede alterar por muchos factores endógenos y exógenos como son los desórdenes peristálticos, el cáncer, operaciones con cirugía del estómago o intestino delgado, enfermedades del hígado o de riñón, anemias perniciosas, terapia por radiaciones, estrés emocional, desórdenes del sistema inmunológico, administración de antibióticos y envejecimiento. Los disturbios o los cambios en la flora intestinal no son específicos (Torres, 2002).

Figura 3. Influencia de la flora intestinal sobre el huésped



Fuente: Torres Vitela, 2002

La interacción entre la flora intestinal y el huésped se lleva a cabo mediante procesos simbióticos y antagonistas.

### **3.4 MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS**

Las bacterias lácticas comúnmente utilizadas en la preparación de probióticos incluyen algunas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.

En los primeros estudios las cepas utilizadas para fermentar productos de la leche para el consumo humano poseían cualidades como probióticos. Después se llegó a la conclusión que eran más apropiadas las cepas cuyo origen era el tracto intestinal humano y que adicionalmente a las bacterias del ácido láctico se podían utilizar otros microorganismos ya sea solos o combinados. En la actualidad existen o se utilizan criterios de selección muy estrictos para obtener cepas funcionales de probióticos. Se ha generalizado que las cepas deben de ser del origen del huésped, muy bien caracterizadas, capaces de sobrevivir a los rigores del tracto digestivo y a una posible colonización, biológicamente activas; de fácil distribución comercial (Torres, 2002).

#### **3.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS**

- Habitante normal del sitio de aplicación,
- Una cepa capaz de ejercer un efecto benéfico en el huésped,
- No patógena, no tóxica,
- Contener números elevados de células viables; y,

- Capaz de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal (Torres, 2002).

Se reconocen en todo el mundo más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos en humanos (Rivero, 2000)

#### Microorganismos usados como probióticos en humanos

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>L.plantarum</i>	<i>Bif.infantis</i>
<i>L.casei</i>	<i>Bif.adolescentis</i>
<i>L.casei spp.rhamosus</i>	<i>Bif. Longum</i>
<i>L.delbrueckii spp.bulgaricus</i>	<i>Bif. breve</i>
<i>L.fermentum</i>	<i>Strep.Salvarius spp.thermophilus</i>
<i>L.reuteri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Saccharomyces boulardi</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactococcus lactis spp.lactis</i>	<i>Lactococcus lactis spp.cremoris</i>

La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y son utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados (Torres, 2002).

#### 3.4.2 SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS

La resistencia a la bilis, basada en la habilidad relativa de crecer en la presencia de ácidos de la bilis, varía enormemente entre cepas de cada especie de bacterias probióticas. La cepa que se use debe ser estable

durante la producción y almacenamiento del alimento que contiene el microorganismo probiótico. En el caso de producto lácteos fermentados, si el microorganismo probiótico se usa como parte de cultivo iniciador, es muy deseable que crezca bien en el producto lácteo a fermentarse en números suficientes para proporcionar oportunidades mayores las que proporcionan el beneficio potencial. La característica más importante es por supuesto que la cepa producirá el efecto deseado (Stanley, 2000).

No existen estudios concluyentes y aún existen estudios contradictorios acerca del uso de probióticos. Sin embargo, se ha aceptado de manera generalizada que debe existir una manera más rigurosa a la selección de la cepa lo cual puede llevar a mejores resultados. Estos incluyen algunos aspectos como los que se mencionan a continuación:

- Propiedades intrínsecas de cepas seleccionadas para uso probiótico por ejemplo: Factores de adhesión, resistencia a antibióticos.
- Efectos de los productos metabólicos de las bacterias.
- Grado de toxicidad por ingestión de cantidades extremadamente grandes de las bacterias.
- Estimar la propiedad infectiva *in vitro*. Probar su efectividad en modelos de animales, inmunocomprometidos.
- Medir la dosis de repuesta.
- Señalar el efecto de una dosis masiva sobre la composición de la microflora intestinal del adulto (Torres, 2002).
- Señalar efectos clínicos en voluntarios humanos en varios estados específicos de enfermedad.

- Seguimiento epidemiológico de la gente que ingiere grandes cantidades del probiótico nuevo.
- Medida rigurosa de seguridad en cepas genéticamente modificadas y en cepas obtenidas de animales.

No debe esperarse que una cepa produzca todo los beneficios potenciales, Adicionalmente, que sea deseable que tengan una historia de uso para producir alimentos lácteos fermentado (Stanley, 2000).

Muchos de estos criterios están basados en una extensiva experiencia con la selección de microorganismos, propagación (viabilidad, compatibilidad tecnológica) y uso seguro de bacterias ácido lácticas en alimentos (no patógenas, no tóxicas, estables genéticamente, viabilidad), sin embargo estos criterios de selección parecen controversiales por que sus mecanismos por los cuales los probióticos ejercen un papel funcional no son completamente entendidos (Adeberth, 1998)<sup>2</sup>. El cuadro 8 presenta una recopilación de criterios utilizados en la selección de probióticos, la cual esta representada por cuatro categorías básicas: conveniencia, compatibilidad tecnológica, competitividad, cualidades y funcionalidad.

**Cuadro 8 Criterios de selección de cepas probióticas**

Conveniencia	Exacta identificación taxonómica
	Habitante normal de las especies aplicadas: origen humano para probióticos humanos.
	No tóxica, No patogénica, condición GRAS*.
Compatibilidad tecnológica	Sujeto a producción en masa y almacenamiento: crecimiento adecuado, concentración, almacenamiento y distribución.
	Viabilidad a altas concentraciones ( $10^6$ - $10^9$ )
	Estabilidad de características deseables durante la preparación del cultivo, almacenamiento y entrega.
	Proporcionar cualidades organolépticas deseables, en procesos de fermentación
	Genéticamente estables
Competitividad	Capaz de sobrevivir, multiplicación y actividad metabólica en el sitio de aplicación.
	Resistencia a la bilis
	Resistencia a jugos gástricos
	Capaz de competir con la microflora normal, incluyendo las mismas o estrechamente especies, altamente resistente a bacteriocinas y ácidos producidos por microflora residente.
	Posible adherencia y colonización.
Cualidades y Funcionalidad	Capaz de ejercer uno o más beneficios a la salud documentados clínicamente (Ej.: tolerancia a la lactosa).
	Antagonismo hacia bacterias patógenas.
	Producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y otros componentes inhibitorios).
	Inmunoestimulación
	Antimutagénico
	Anticancerígeno
	Producción de componentes bioactivos (enzimas, péptidos)

GRAS: Generalmente reconocidas como seguras, Fuente: Klaenhammer, 1999

Dado que las propiedades probióticas están relacionadas con las cepas, es necesario la clasificación e identificación de la cepa, la mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias Gram. Positivas, y se clasifican dentro del grupo de bacterias ácido lácticas.

### 3.4.3 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La mayoría de las bacterias reconocidas como probióticas pertenecen al grupo de las BAL (Bacterias Ácido Lácticas). Este grupo de bacterias ha sido extensamente estudiado.

Las BAL son cada vez más utilizadas en la elaboración industrial de productos probióticos, tradicionalmente especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* son las bacterias ácido lácticas de mayor interés (Saloff-Coste, 1994).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se ha usado para fermentar alimentos por al menos 4000 años. Sin entender la base científica, las personas usaban BAL para producir cultivos a alimentos con una mejor conservación y diferentes sabores característicos a partir del alimento original. Una amplia variedad de alimentos incluyendo salchicha, jamón, vino, sidra, cerveza, aceitunas, encurtidos contienen BAL y otros microorganismos considerados GRAS (Spreer, 1991).

Las BAL se usan alrededor del mundo en muchos productos lácteos fermentados, incluyendo yogur, queso, mantequilla, suero de leche, kéfir y

koumiss. Las BAL se refiere a un grupo grande de bacterias con muchos subgrupos que contiene únicas características, pero todas ellas tienen rutas metabólicas y productos finales similares.

Las bacterias ácido lácticas comúnmente producen una amplia variedad de sustancias antibacteriales incluyendo bacteriocinas, así como ácido láctico y peróxido de hidrógeno (Saloff-Coste, 1994).

Las BAL son organismos unicelulares (procariontes). Como otras bacterias, se reproducen por división celular, es decir, forman réplica exacta de células hija de la célula madre (excepto en casos raros de mutaciones). Se reproducen rápidamente, duplicando el tiempo de 30-90 minutos en condiciones óptimas. Las BAL son un grupo diverso, están clasificadas juntas debido a su principal producto final común del metabolismo, el ácido láctico. Pueden tolerar condiciones ácidas durante varias semanas con pH alrededor de 4, son Gram-positivas, y son anaerobias pero aerotolerantes. Sus formas son principalmente cocos (esferas), bacilos (bastones), o espirilos, también pueden tener la forma "Y" (bífida), como en el caso de las bifidobacterias (Saloff-Coste, 1994).

Las BAL pueden estar divididas en categorías generales o pueden clasificarse con base en sus productos finales metabólicos o a su temperatura óptima de crecimiento. Las BAL homo fermentativas producen ácido láctico como su principal producto final (70-90%), considerando que las bacterias heterofermentativas producen otros compuestos como ácido acético,  $CO_2$  y etanol además de por lo menos 50% ácido láctico). Estas

bacterias tienen en general complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones por las que abundan en un medio rico como la leche (Bourgeois et al, 1995).

Las BAL son generalmente aerotolerantes, aunque algunas especies, como las bifidobacterias, son anaerobias estrictas, el género menos sensible al oxígeno son los *Streptococcus*.

#### 3.4.3.1 TAXONOMÍA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las BAL pertenecen a varios géneros las cuales son divididas en especies. Las especies pueden ser divididas en varias subespecies y cepas, como en el caso de *Lactococcus lactis* ssp. var *lactis*, *diacetylactis* (referida como *Lc. diacetylactis*). Su habilidad para fermentar azúcares específicos, la temperatura óptima para su crecimiento, los nutrientes necesarios y la presencia de enzimas especiales son características de las BAL.

Los métodos por clasificar entre género, especies o cepas han desarrollado la apariencia morfológica y las condiciones de crecimiento y el comportamiento fisiológico, así como las vías metabólicas y enzimas. Las técnicas más exactas involucran estructura molecular y la información genética (Saloff-Coste, 1994).

Como en los otros campos de la ciencia, la taxonomía está evolucionando continuamente el sistema. Ha habido recientes cambios y futuras revisiones son probables. En la taxonomía de las BAL, por ejemplo, bacterias mesofílicas que fueron clasificadas originalmente como *Streptococos* se ha

cambiado al género *Lactococcus*. Es importante tener los métodos universales de identificación de las BAL usadas en la fermentación de alimentos para estar de acuerdo con las regulaciones y asegurar que las cepas pertenecen a las especies reconocidas como GRAS. Las bacterias ácido lácticas se clasifican según su morfología y el tipo de fermentación de ácido láctico (ver cuadro 9).

Tabla9. Tipos de fermentación ácido láctica

Género	Morfología	Tipo de fermentación	Crecimiento aeróbico	Principales especies
<i>Streptococcus</i>	Diplococcus Streptococos	Homo	+	<i>S.lactis</i> , <i>S.cremoris</i> <i>S.termophilus</i> , <i>S.faecalis</i>
<i>Pediococcus</i>	Tetracocos	Homo	+	<i>P.cerevisiae</i> <i>P.halophilus</i>
<i>Leuconostoc</i>	Diplococos	Hetero	+	<i>L.mesenteroides</i> <i>L.citrovorum</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	Homo	+	<i>L.bulgaricus</i> <i>L.helveticus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.salivarius</i> <i>L.casei</i> <i>L.plantarum</i> <i>L.fermentum</i>
<i>Bifidobacterium</i>	Bacilos	Homo	+	<i>L.brevis</i>
	Bacilos	Hetero	-	<i>B.bifidum</i> , <i>B.infantis</i> <i>B.Longum</i> <i>B.adolescentis</i> <i>B.termophilum</i> <i>B.pseudolongum</i>

Fuente: Torres vitela, 2002

#### 3.4.4 VÍAS METABOLICAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

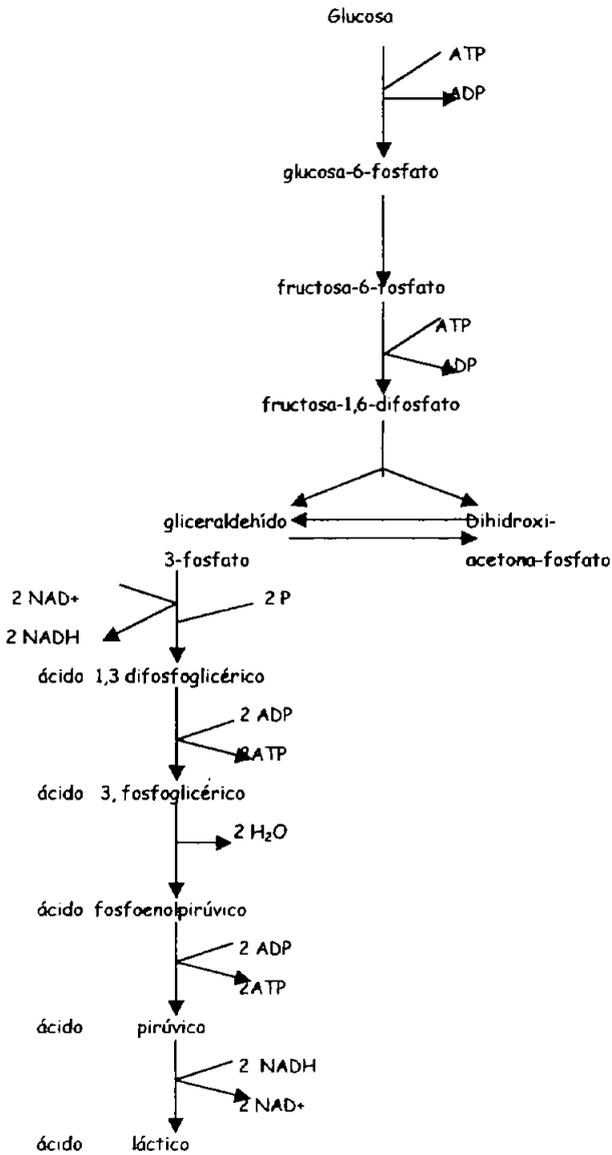
Las BAL son microorganismos delicados con complejas y variadas necesidades nutritivas. Requieren como fuente de carbono y de energía para producir ATP hidratos de carbono, principalmente la lactosa y glucosa. Las proteínas de la leche, péptidos, aminoácidos específicos, y los derivados ácidos nucleicos también son necesarios para facilitar el nitrógeno para la síntesis de las proteínas. Varias vitaminas, en particular la vitamina del complejo B, son a menudo necesarias como catalizadores para reacciones enzimáticas, pero las necesidades de vitaminas y minerales específicos varían entre las especies (Saloff-Coste, 1994).

La ruta mayor del metabolismo de los hidratos de carbono de las BAL empieza con el transporte activo de lactosa a través de la membrana de la célula. La lactosa se convierte en glucosa y galactosa.

En las bacterias homofermentativas la producción de lactato pasa por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Fig.4). Las bacterias heterofermentativas no tienen fructosa-difosfato-aldosa y por lo tanto degradan los glúcidos por la vía llamada de las pentosas fosfatos o de las hexosas fosfatos (Fig. 5) (Bourgeois et al, 1995). La diferencia entre estos dos grupos es detectable por la liberación de  $O_2$ .

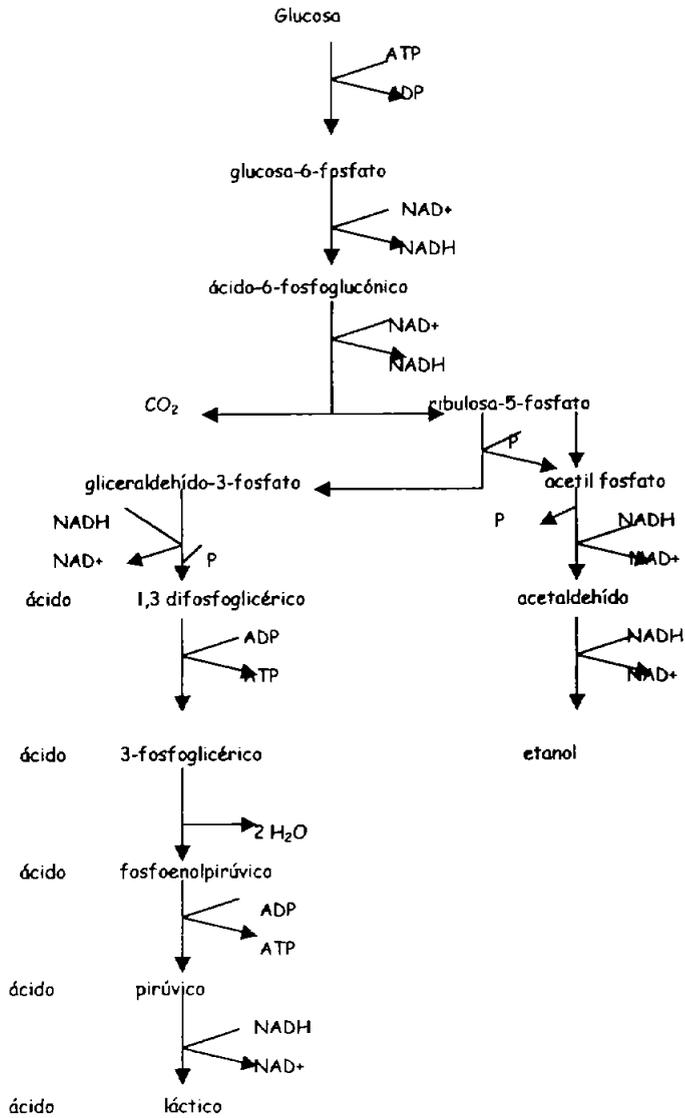
Vía homofermentativa, se sintetizan dos moléculas de ATP por mol de glucosa, mientras que por vía heterofermentativa sólo se sintetiza una,

Fig 4. Fermentación láctica homofermentativa



Fuente: Bourgeois et al, 1995

Figura 5. Fermentación láctica heterofermentativa

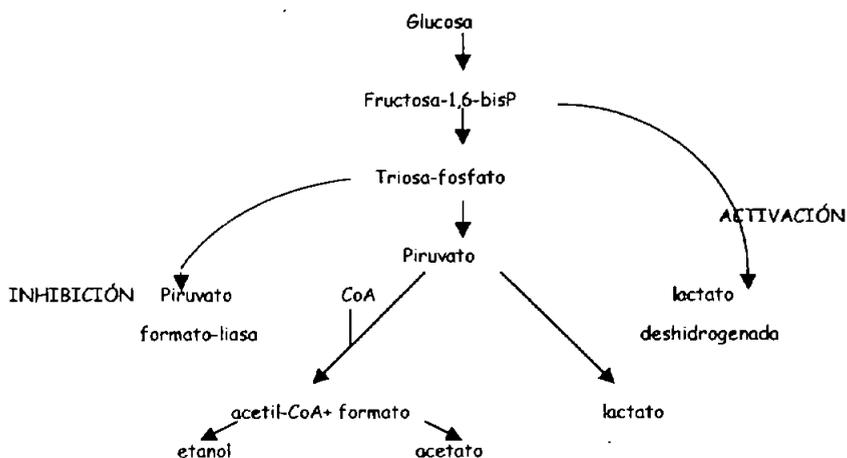


Fuente: Bourgeois et al, 1995

Las BAL no puede sintetizar varios aminoácidos esenciales, y por consiguiente la proteólisis de proteínas y péptidos son necesarios para su crecimiento. Las BAL poseen enzimas proteolíticas que se encuentra en la pared de la célula, en la membrana de la célula, y en el citoplasma pero sólo aproximadamente 2% de caseína se rompen durante la fermentación de la leche ( Saloff-Coste, 1994).

Muchos *Lactobacillus* homofermentativos, además de ácido láctico, producen formato, etanol y acetato en determinadas condiciones. No se trata de una desviación de la ruta hacia la de las pentosas, sino que una parte del piruvato se transforma en acetyl CoA (Fig. 6). En condiciones de exceso de nutrientes, el piruvato es cuantitativamente transformado en lactato, pero en condiciones de carencia, un poco de piruvato es metabolizado en etanol y acetato. Este mecanismo es favorable para la bacteria porque durante la conversión del piruvato en acetato se sintetiza ATP (Bourgeois et al, 1995).

Figura 6. Regulación del metabolismo del piruvato



Fuente: Bourgeois et al, 1995

Las bacterias lácticas que pertenecen a los grupos A, B o C del cuadro 10, referido a bacterias lácticas intestinales, pueden llegar a sobrevivir en el intestino humano. Aquellas que pertenecen al grupo D, se refiere a bacterias lácticas derivadas de la leche, que no llegan al intestino vivas y se utilizan como iniciadores en productos derivados de la leche.

**Cuadro 10. Características y distribución de bacterias ácido lácticas**

Grupo	Distribución y Características	Especies
A	De mayor prevalencia en el intestino: idóneo de alcanzar el alivio del intestino	Bifidobacteria <i>B.bifidum, B.infantis, B.breve, B. adolescentis, B. longum</i>
B	Encontrado frecuentemente en el intestino, capaz de lograr el alivio en el intestino.	<i>Lactobacilli:</i> <i>L.acidophilus, L.fermentum, L.sativalius,</i>
C	Encontrado ocasionalmente en el intestino: capaz de extenderse en el intestino	<i>L.casei, L.pantarum, L. brevis, L.buchneri</i>
D	No se encuentra en el intestino, principalmente usado para cultivos iniciadores de alimentos lácteos.	<i>L. bulgaricus, L. helveticus, Lacto-Streptococci: S.cremoris, S.termophilus, S.diacetilactis.</i>

Fuente: Torres Vitela, 2002.

### 3.4.5 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS

Los avances en las técnicas de tipificación molecular permiten contar en la actualidad con técnicas de identificación y diferenciación de cepas bacterianas mediante el análisis de la composición de moléculas biológicas tales como ácidos grasos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos. De estas, las técnicas más poderosas son las que se basan en métodos moleculares empleadas para tipificar patrones específicos de ADN que son característicos de una cepa en particular. Estas técnicas permiten caracterizar rápidamente grandes cantidades de colonias aisladas

proporcionando información sobre la relación de cada cepa aislada con otra considerada como referencia (Escalante, 2000).

Las técnicas desarrolladas hasta la fecha se basan en la amplificación directa de los ADNr 16S por medio de PCR, o bien a partir de la extracción del ADN p ARN total.

#### 3.4.5.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERSA (PCR)

La PCR se basa en la repetición de tres procesos: (1) desnaturalización térmica del DNA; (2) hibridación de cebadores (oligonucleótidos) específicos al DNA de cadena sencilla, y (3) extensión enzimática del DNA. El proceso se lleva a cabo en un bloque térmico denominado termociclador. En cada repetición se duplica la cantidad de DNA específico, así en una reacción típica de 30-40 ciclos se generan  $2^{30-40}$  moléculas del DNA de interés (amplicones) (Dennis, Y.M; 1998).

La temperatura de hibridación de los cebadores condiciona la especificidad del proceso; cuando no se conoce perfectamente la secuencia del DNA de interés se puede utilizar una temperatura inferior a la óptima o también se pueden diseñar cebadores.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flaqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis de ADN

la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Los buffers de PCR que se utilizan normalmente contienen KCL, Tris y MgCl<sub>2</sub>. (Dennis, Y.M; 1998).

#### 3.4.5.2 TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

Las siguientes técnicas han sido empleadas en la identificación de probióticos en productos lácteos y en el análisis de la flora intestinal.

Generalmente las muestras son primero enriquecidas para separar la fracción bacteriana por centrifugación diferencial y pueden ser empleadas directamente como templado para PCR o bien, extraer el ADN y el ARN total como primer paso (Escalante, 2000).

Sin embargo algunas limitaciones de estas técnicas que podrían generar una serie de interpretaciones erróneas. Una limitación es la concerniente a la especificidad de los cebadores (primers) "universales" empleados, ya que estos no son homólogos para todas las bacterias, lo que resulta en una amplificación poco eficiente. Para resolver esta limitación pueden ser empleados diferentes juegos de cebadores con especificidad a diferentes regiones.

Seguido al aislamiento del producto amplificado se emplea la separación de ADNr 16S individuales por electroforesis en gel.

- RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymeric DNA-Polymerase Chain Reaction).
- PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Esta técnica requiere de cultivar el microorganismo, el método implica el análisis de todo el genoma en lugar de solo una parte, requiere del uso de enzimas de restricción (endonucleasas), es aplicable a la mayoría de bacterias aisladas. No requiere del conocimiento de alguna secuencia del organismo ( Escalante, 2000; Reuter, G, 2002).
- PCR-múltiple (multiplex PCR). Se pueden incluir en la misma reacción diversos pares de cebadores que amplifiquen fragmentos diferentes de DNA; de esta forma se pueden detectar genes diversos de un mismo organismo o detectar diferentes organismos al mismo tiempo( Escalante, 2000; Reuter, G, 2002).
- El desarrollo de las técnicas de PCR *in situ* y de hibridación fluorescente *in situ* o FISH (por sus siglas en inglés), se basa en el uso de cebadores y sondas con una especificidad a diferentes niveles taxonómicos.

### 3.5 BIFIDOBACTERIAS

En 1900, Tissier describió por primera vez a las bifidobacterias. Desde ese momento, su clasificación ha evolucionado continuamente, y actualmente incluye alrededor de treinta especies. En general, son bastones Gram positivos y anaerobios estrictos, que frecuentemente tienen necesidades nutricionales especiales y crecen lentamente en la leche. Muy pocas cepas se han adaptado lo suficientemente bien a la leche y pueden crecer en número

suficiente como para sobrevivir durante la vida de anaquel de las Leches Fermentadas. Las bifidobacterias producen tanto ácido láctico como ácido acético como productos finales más importantes de su metabolismo (heterofermentativo), muchos microbiólogos las consideran como bacterias ácido lácticas, exceptuando algunos casos (Symons, 1994)).

Su nombre viene de la observación la cual, estas bacterias Gram positivas existen a menudo en bastones en forma de Y o forma "bifida". Las Bifidobacterias son anaerobias con una ruta metabólica especial que permite producir tanto ácido láctico como acético. Requieren frecuentemente necesidades nutritivas especiales, por lo que es a menudo difícil aislar y crecer en laboratorio a estas bacterias (Symons, 1994). El pH de crecimiento es 6-7, la temperatura optima de crecimiento es 37-41°C, con una temperatura máxima de crecimiento de 43-45°C.

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y están presentes durante toda la vida, apareciendo a los pocos días después del nacimiento, la población parece ser relativamente estable hasta la edad avanzada. Constituyen una de las diversas especies predominantes de la microflora del colon, junto con *Peptostreptococcus*, *Eubacterias*, *Clostridia*, y *Bacteroides*, las cuales se encuentran presentes en niveles que van de  $10^8$ - $10^{11}$  bacterias/g de material del colon. Las bifidobacterias difieren de las bacterias ácido lácticas en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación. La clasificación de las bifidobacterias ha cambiado muchas veces desde que se descubrieron en 1899 en las heces de bebés alimentados con leche materna. Desde 1994, se ha

incluido en la lista a tres especies adicionales (*B. lactis*, *B. inopinatum*, y *B. denticolens*), con un total actualizado de 32 especies, en el cuadro 11 se presentan las especies de en la especie humana (Saloff-Coste, 1998).

**Cuadro 11. Descripción de especies de *Bifidobacterium* en la especie humana**

<i>B.adolescentis</i>	Predominante en las heces fecales de adultos, frecuentemente se encuentra en aguas residuales.
<i>B. angulatum</i>	Característica en forma plisada "V", más sensible al oxígeno que la mayoría de las bifidobacterias, aislada de heces de adultos y aguas residuales.
<i>B. bifidum</i>	Predominante en heces de adultos.
<i>B. Pentium</i>	Morfológicamente similar a <i>B. infantis</i> , aislada de caries dentales, potencialmente patógena, también se encuentra en la vagina y heces de adultos.
<i>B. infantis</i>	Predomina en heces de infantes alimentados con leche humana, también se encuentra en la vagina.
<i>B. longum</i>	Aislado de adultos y lactantes
<i>B. catenulatum</i>	Células en forma de cadenas, encontrado en heces de adultos y aguas residuales.
<i>B.breve</i>	Se encuentra en el intestino y vagina; mayormente relacionado con <i>B. infantis</i> y <i>B.longum</i> .

Fuente: Robinson, 2000

### Taxonomía

La taxonomía de las bifidobacterias ha cambiado continuamente desde que fueron aisladas por primera vez. Se les han asignado a los géneros *Bacillus*, *Bacteroides*, *Norcardia*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* entre otros, antes de que se reconociera como un género separado en 1974.

Actualmente no hay ninguna prueba que permita la determinación del origen de una cepa y así la clasificación como "humano" o "animal" el origen es arbitrario basado en la taxonomía de la cepa. Muchas de las especies están presentes en animales y humanos, la flora humana se ha estudiado

extensivamente, los estudios en flora animal son menos abundantes (Macrae et al, 1993; Symons, 1994).

En la manufactura de productos lácteos fermentados, *B. bifidum* es la especie más utilizada seguida se encuentran *B. longum* y *B. breve*. Las bifidobacterias son usualmente utilizadas en combinación con otras bacterias ácido lácticas por su lenta producción de ácido (Robinson et al, 2000).

Las bifidobacterias ingeridas en grandes cantidades deben alcanzar el sitio de acción en el intestino para poder ejercer un efecto probiótico. Se ha recomendado un número mínimo de  $10^6$ -  $10^7$  de microorganismos vivos/g en el contenido intestinal (Saloff-Coste, 1994).

Existen diferencias marcadas entre cepas en cuanto a su habilidad para tolerar las sales y ácidos biliares, hecho que hace que su supervivencia sea un criterio de selección importante. Una vez que las bifidobacterias alcanzan su sitio de acción, deben ser capaces de ejercer el efecto deseado; la función es esencial. Esta capacidad sólo se puede reconocer a través de estudios in vivo e in vitro, utilizando a los microorganismos específicos en cuestión. En cualquier proporción, las cepas de bifidobacterias en los intestinos humanos en particular, varían enormemente de un individuo a otro, y todas las bifidobacterias ingeridas se pueden considerar como "extrañas" al consumidor. Por lo tanto, el origen en sí no es un criterio significativo de selección (Saloff-Coste, 1998).

### 3.6 LACTOBACILLUS

El género *Lactobacillus* es diverso y consiste de un número de diferentes especies. Morfológicamente, algunos bacilos son bastones delgados y largos; son Gram-positivos y no formadores de esporas, casi todos son inmóviles, pero se han señalado excepciones. Son anaerobios, pero después de cultivos continuos, algunas cepas pueden desarrollarse en presencia de aire. Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios de cultivo ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero.

Los lactobacilos incluyen cerca de 25 especies únicas, y su diferenciación esta basada en la composición de sus productos finales, siendo homofermentativas y heterofermentativas (Robinson et al, 2000).

Entre algunas especies de lactobacilos que se pueden encontrar: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermenti*.

#### 3.6.1 *Lactobacillus bulgaricus*

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es una bacteria homofermentativa anaeróbica, normalmente aislada de yogur y queso. Los hidratos de carbono que fermenta son fructosa, glucosa y lactosa (90% o más de las cepas) (Robinson et al, 2000).

## Taxonomía

Los lactobacilos tienen un tamaño de  $0.5-0.8 \times 2-9 \mu\text{m}$  y se presentan aislados, en parejas o en cadenas. La temperatura óptima es de unos  $45^\circ\text{C}$ , la máxima es de  $52^\circ\text{C}$  y la mínima de  $21-34^\circ\text{C}$ ; pero estas temperaturas varían mucho en las diversas cepas, nulo crecimiento a  $15^\circ\text{C}$ , tiene la habilidad de crecer a pH inferiores a 5, y presenta metabolismo fermentativo aun en presencia de aire.

### Importancia en la industria de alimentos

*L. bulgaricus* y muchas otras bacterias ácido lácticas juegan un papel importante en fermentación de alimentos, causando efectos en el sabor, teniendo efectos de conservación en el producto fermentado. Es la especie que se encuentra con mayor frecuencia en las leches fermentadas. Ha sido usada como una cepa adjunta a cultivos iniciadores (Robinson et al, 2000).

Las cepas de *L. bulgaricus* son altamente sensibles al jugo gástrico y a la acidez de la bilis, pobremente sobreviven al tránsito gastrointestinal. Sin embargo se ha demostrado que en personas con intolerancia a la lactosa (puede ocurrir debido a la reducción en la actividad de la lactasa.) es mejorado con productos que contengan a esta cepa. La enzima es parcialmente protegida por las paredes de la bacteria durante su paso a través del estomago, pero en presencia de la bilis en el intestino delgado, rompe su estabilidad.

### 3.6.2 *Lactobacillus acidophilus*

*L. acidophilus* (su nombre se deriva de *acidus* =ácido y *philus* =amante) es un bastón homofermentativo obligado y anaerobio facultativo cuyo producto final principal es el ácido láctico. Se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal en humanos y animales, en la boca y la vagina humanas, y en algunas leches que se fermentan de manera tradicional, tales como el kéfir (Saloff-Coste, 1997).

Debido a que el *L. acidophilus* es una especie genéticamente heterogénea, su clasificación ha sido difícil. De hecho, algunas veces se ha etiquetado erróneamente como *L. acidophilus* a otras especies (por ejemplo, algunas cepas de *Lactobacillus casei*). La homología ADN-ADN condujo a la identificación de seis especies principales (*L. acidophilus* (A1), *L. crispatus* (A2), *L. amylovorus* (A3), *L. gallinarum* (A4), *L. gasseri* (B1), y *L. johnsonii* (B2), que presentan diferencias claramente observables pero que constituyen el mismo grupo *L. acidophilus*. Recientemente se ha desarrollado una técnica nueva y más rápida, llamada ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD) PCR, que puede hacer la diferenciación entre las diversas cepas de cada una de las especies del *L. acidophilus* (Saloff-Coste, 1997).

#### Taxonomía

Las especies de *L. acidophilus* son bastones Gram-positivas, catalasa -negativa, tienen un tamaño de 0.5-1 x 2-10 µm, se presentan aislados, en parejas o en cadenas cortas. La temperatura óptima es de 37°C, la máxima de 43-48°C. Por debajo de 20°C no se registra crecimiento alguno (Robinson et al, 2000).

*L. acidophilus* es una bacteria intestinal típica, que se encuentra en las heces fecales del hombre (casi siempre de los niños y muy escasamente en los adultos). A partir de las heces de niño se pueden aislar mediante el método de enriquecimiento. La posibilidad de multiplicarse en el intestino ha traído la atención en lo que se refiere a la utilización de las leches fermentadas.

El *L. acidophilus* tiende a crecer despacio en la leche, conduciendo al riesgo de un sobrecrecimiento de microorganismos indeseables, y las cepas que sí tienen un crecimiento adecuado tienden a producir sabores desagradables. Irónicamente, la mayoría de las cepas del *L. acidophilus* no sobreviven adecuadamente en la leche fermentada debido al pH bajo (después de todo, no son tan amantes del ácido), y es difícil mantener un número grande de ellos en el producto. Por estas razones, los productos de leche fermentada que contienen *L. acidophilus* frecuentemente se producen en forma separada y después se mezclan. Algunos ejemplos incluyen la adición del *L. acidophilus* a los cultivos de yogurt (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*), a *Lactococcus lactis*, o a las bifidobacterias y a *Pediococcus acidilactici* (Saloff-Coste, 1997).

Se considera que *L. acidophilus* es un probiótico. Los efectos potenciales se pueden optimizar si las células son capaces de sobrevivir primero a la acidez del estómago, la cual puede alcanzar un pH tan bajo como 1.5, y después a las concentraciones de hasta 2.0% de ácidos biliares en el intestino delgado. Los estudios *in vivo* han demostrado que la supervivencia del *L. acidophilus* es superior a aquella de *L. bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus*. La habilidad para sobrevivir varía entre las diferentes cepas.

*L. acidophilus* sobrevive adecuadamente al tránsito, pero no existe una prueba definitiva de que se adhiera o colonice los intestinos. Es posible que su tránsito continuo a través de un consumo regular sea un acercamiento alternativo para asegurar el mantenimiento bacteriano adecuado necesario para obtener el efecto probiótico que se desea (Saloff-Coste, 1997).

### 3.6.3 *Lactobacillus brevis*

*L. brevis* es una bacteria que se encuentra en la leche, quesos, granos de kéfir, en partes vegetales, en pastas ácidas de levaduras, carnes fermentadas, en la boca y tracto gastrointestinal de la especie humana.

#### Taxonomía

*L. brevis* son bacilos cortos con extremos redondeados, semejándose, a veces, a estreptococos, se presentan aislados o en cadenas cortas, aunque en ocasiones en filamentos largos. Es un bastón heterofermentativo obligado. Tiene un tamaño de 0.7-1.0 x 2.0-4.0µm. La temperatura óptima de 30°C, máxima de 37°C y mínima 15°C (Robinson et al, 2000).

Los carbohidratos fermentados por *L. brevis* incluyen fructosa, glucosa, arabinosa y maltosa.

*L. brevis* ha sido utilizado en la producción de una amplia variedad de productos fermentados, algunos de estos alimentos fermentados se han desarrollado de la fermentación natural a la fermentación con cepas iniciadoras (Robinson et al, 2000).

### 3.6.4 *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* es una bacteria ácido láctica (BAL) que se encuentra en muchos productos alimenticios incluyendo las leches tradicionales como el kéfir y laban zeer, en una variedad de quesos tales como provolone, parmesano y manchego y en productos más recientes como yakult, actimel, Gefilus, y Vifit. *L.casei* puede ser usado sólo o en asociación con otras BAL para crear diferentes propiedades organolépticas, recientemente se ha usado en nuevos productos de leche que ofrecen sabor original y ciertos beneficios (Saloff-Coste, 1995).

#### Taxonomía

Cepas de *L.casei* se encuentran naturalmente en verduras, leche y carnes fermentadas, así como en el intestino, la boca humana, y el ambiente. El nombre de *L.casei* se usó por primera vez en 1919, y su nomenclatura reconoce su relación íntima a queso: ambos casei y caseína (la proteína principal en la leche) tienen su origen en la palabra del latín "caseus" que significa queso (Saloff-Coste, 1995).

*L.casei* fue considerada por ser una especie la cual fue dividida en varias subespecies. Esta clasificación ha sido recientemente revisada usando la tecnología más sofisticada ADN-ADN. *L. casei* se conoce ahora como un grupo de varias especies, y cada especie es equivalente a una subespecie anterior). Aunque cada especie difiere en ciertas características (Ej.: temperatura óptima de crecimiento, la habilidad para fermentar hidratos de carbonos específicos), son genéticamente muy similares. Un ejemplo de la

reciente reclasificación es *Lactobacillus GG*, que fue primero clasificado como una subespecie de *L. acidophilus*, y posteriormente como un miembro de *L. casei*, recientemente ha sido reclasificado como *L. rhamnosus*.

Como miembros del género *Lactobacillus*, *L. casei* es Gram-positivo formando células en forma de bastón. Difieren de otros lactobacilos en varias maneras. Son más pequeños en tamaño que *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, y *L. helveticus*, son heterofermentativas facultativas y mesófilicas. Pueden fermentar un rango más amplio de hidratos de carbono que la mayoría de los lactobacilos encontrados en leches fermentadas. Aunque son agrupados debido a similitudes, cada especie tiene rasgos únicos, como la habilidad de tolerar el calor a 72°C (*L. paracasei subsp. tolerans*) (Saloff-Coste, 1995).

El *Lactobacillus casei* ha sido utilizado en productos de leche fermentada. Esta bacteria ácido láctica es resistente tanto a los ácidos como a la bilis y por lo tanto, puede sobrevivir al tránsito del tracto gastrointestinal y ejercer un efecto en los intestinos.

*L. casei* es resistente a la acidez y a la bilis pH de 3-7., pueden sobrevivir el tránsito a través del estómago, particularmente cuando es ingerido con alimentos o productos lácteos, los cuales aumentan el pH por encima de 3. En el ileón alcanza cantidades suficientes para tener un efecto fisiológico (5-10% proporción de supervivencia).

Investigaciones recientes se han enfocado en los posibles efectos probióticos, en particular, en la prevención y tratamiento de algunos tipos de diarrea. Sus mecanismos de acción no están todavía aclarados, pero parecen estar

relacionados con la habilidad de alterar la actividad de la microflora intestinal y también la habilidad para modular el sistema inmunológico (Saloff-Coste, 1995).

Además de los probióticos que se han discutido con anterioridad, otras bacterias, algunas bien conocidas y otras recientemente descubiertas, ofrecen beneficios adicionales en la salud como *L. helveticus*, *L. plantarum* y *L. reuteri*. Estas bacterias ácido lácticas tienen características microbiológicas y metabólicas diferentes de las que se han enlistado anteriormente, pero también exhiben efectos sobre la salud, tales como la estabilización de la microflora intestinal o la reducción en la duración de la diarrea, en la figura 7 se presentan las fotografías de bacterias probióticas.

Las posibles interacciones entre bacterias ácido lácticas y cepas probióticas seleccionadas para la elaboración de productos lácteos fermentados, es un factor importante, se deben tener la mejor combinación para optimizar el proceso tecnológico y la sobrevivencia en el producto durante el almacenamiento.

Las interacciones de bacterias probióticas y BAL muestran los siguientes comportamientos: estimulación, retraso, completa inhibición ó ningún efecto entre ellas. La cinética de las cepas aplicadas tienen que ser adaptadas a las condiciones del proceso y los factores intrínsecos que prevalecen en el alimento.

La relación entre BAL + bacterias probióticas tiene efecto en la acidificación, textura y conteo de células probióticas en la elaboración de leches fermentadas (45).

Los probióticos disponibles comercialmente pueden contener una sola cepa o mezcla de cepas, por consiguiente la información específica sobre las propiedades de la cepa deben estar disponibles para la optimización del proceso.

Algunas cepas probióticas producen exopolisacáridos, bacteriocinas, vitaminas o enzimas útiles, en el caso de la fabricación del yogur algunas cepas probióticas podrían mejorar la textura, así como aumentar la viscosidad evitando la sinéresis, por acción de los polisacáridos formados.

En la elaboración de productos fermentados conteniendo cepas probióticas es recomendable utilizar una temperatura de fermentación de 37-40°C ya que la mayoría de las cepas probióticas se multiplican bastante bien a este rango.

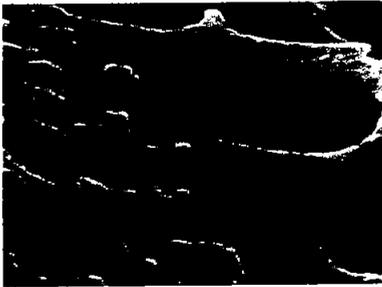
Figura 7. Microfotografías de bacterias probióticas



*Lactobacillus casei*



*Lactobacillus acidophilus*



*Lactobacillus plantarum*



*Bifidobacterium bifidum*



*Lactobacillus reuteri*



*Lactobacillus fermentum*



*Lactobacillus rhamnosus*

Fuente: [alb.ac.be/Bacteries Lactiques.gif](http://alb.ac.be/Bacteries%20Lactiques.gif)

CAPÍTULO IV  
LECHES FERMENTADAS

## CAPÍTULO IV

### LECHES FERMENTADAS

La leche es un alimento muy versátil, ya que mediante diversas operaciones y procesos puede transformarse en un gran número de alimentos, entre ellos los denominados genéricamente leches fermentadas. La transformación de la leche en otros productos, como leches fermentadas, es antiquísima y muy variada, a la vez que ampliamente distribuida en todo el mundo (García, 2000).

Existen referencias sobre el consumo de quesos y leches fermentadas que datan de hace más de 10,000 años, pero los procesos fermentativos se empezaron a conocer hace sólo unos 100 años (Early, 1998).

Las leches fermentadas se originaron en oriente próximo, en los antes llamados países del este, en los Balcanes y en los países del este del Mediterráneo. Hay un acuerdo general en que las primeras leches fermentadas fueron elaboradas por tribus nómadas a partir de leche de cabra y de oveja.

El término "fermentadas" describe el proceso de inoculación o siembra de la leche con microorganismos que transforman la lactosa en ácido láctico. En las rutas metabólicas de estas bacterias se originan además dióxido de carbono, ácido acético, diacetilo, acetaldehído y muchos otros compuestos

que determinan el sabor, textura y aroma característicos de cada uno de los productos lácteos fermentados (Early, 1998).

El ácido láctico ejerce un efecto protector porque inhibe el desarrollo de muchos microorganismos alterantes y patógenos; por esta razón, los productos lácteos fermentados se conservan durante más tiempo que la leche no acidificada. Sin embargo, el bajo pH del medio no impide el crecimiento de mohos contaminantes en el producto, que forman gas y alteran su sabor y aroma (Early, 1998).

La fermentación de la leche ocurre ya sea en su estado natural, o cuando ha sido modificada de alguna manera, por ejemplo descremada (sin grasa) o concentrada (con menos agua), lo cual implica la interacción de algunos microorganismos con ella, modificando su sabor, consistencia, y muchas veces mejorando algunas de sus características como digestibilidad, composición, etc. Esta fermentación puede llevarse a cabo por diversos microorganismos solos o sus combinaciones, lo cual da origen a la gran variedad de leches fermentada existentes (García, 2000).

El consumo de estos productos continúa incrementándose por el uso de nuevos microorganismos aislados, que se les atribuye beneficios a la salud. Los cultivos iniciadores juegan un papel central en la realización de estas cualidades (Robinson et al, 2000).

#### 4.1 CONCEPTO DE LECHES FERMENTADAS

*Los productos lácteos fermentados, leches fermentadas ó productos de leche ácida son productos que se caracterizan porque obtienen su carácter ácido y su típica textura por experimentar una fermentación láctica unida a una producción de aroma (Spreer, 1991).*

Distintas especies y combinaciones de especies de *bacterias lácticas acidificantes* fermentan una parte de la lactosa y en ocasiones de la sacarosa añadida a ácido láctico y, en menor medida, también a otros ácidos orgánicos y sustancias aromáticas. La fermentación provoca también la coagulación de las proteínas, que también sufren un cierto grado de desdoblamiento.

El aroma, cuya formación es muy compleja se debe sobre todo a dos compuestos esenciales, el di acetilo y el acetaldehído.

El grupo de microorganismos más importante utilizado en la fabricación de leches fermentadas es el de las bacterias lácticas, muchas de las cuales están consideradas como probióticos. Estos microorganismos no sólo son los más importantes de este ramo de la industria alimentaria, sino que además, es en la industria de los derivados lácteos donde se ha alcanzado por mucho el máximo desarrollo tecnológico de estas bacterias. Un panorama global de los microorganismos utilizados en la elaboración de leches fermentadas se presenta en el cuadro 12 (Torres, 2002).

**Cuadro 12. Microorganismos más comúnmente utilizados en la elaboración de leches fermentadas**

ESPECIE	PRODUCTOS	FUNCIONES
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Jocoque (buttermilk) leches escandinavas	Producción de ácido láctico
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Yogurt, labne, dahi	Producción de ácido láctico
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Yogurt, labne, dahi, leche búlgara	Producción de ácido láctico, aroma y sabor.
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	Yakult, Gefilus	Producción de ácido láctico, aroma y sabor.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche acidófila, yogurt acidófilo, yogurt AB, Bioghurt	Producción de ácido láctico, aroma y sabor. Probiótico
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Cremoris</i>	Jocoque(buttermilk) leches escandinavas	Producción de aroma y sabor
<i>Bifidobacterium longum</i>	Yogurt AB, Biograde	Probiótico
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Yogurt AB, Biograde	Probiótico
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Kefir, Búlgaros y Koumiss	Desarrollo de sabores y aroma. Producción de alcohol.
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>Lactis</i>	Kefir, Búlgaros y Koumiss	Desarrollo de sabores y aroma. Producción de alcohol.
<i>Candida kefyr</i>	Kefir, Búlgaros y Koumiss	Desarrollo de sabores y aroma. Producción de alcohol.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kefir, Búlgaros y Koumiss	Desarrollo de sabores y aroma. Producción de alcohol.

Fuente: Torres Vitela, 2002.

Debido a los frecuentes y recientes cambios de nomenclatura de estos microorganismos, los cuales pueden provocar confusión, en el cuadro 13 se incluyen los nombres antiguos y/o sinónimos de los casos pertinentes (Quintero et al, 1999).

**Cuadro 13. Microorganismos comúnmente utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados**

Nombres recientes Y/o aceptados	Nombres antiguos o Sinónimos inválidos
<b>BACTERIAS</b>	
Género <i>Lactococcus</i> <i>L.lactis</i> ss. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus</i> del grupo N <i>S. lactis</i> , <i>S. lactis</i> ss. <i>lactis</i> , <i>S. lactis</i> ss. <i>diacetyllactis</i> <i>S. diacetyllactis</i> <i>S. cremoris</i> <i>S. lactis</i> ss. <i>cremoris</i>
<i>L.Lctis</i> ss. <i>cremoris</i>	
Género <i>Lactobacillus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.brevis</i> <i>L.casei</i> ss. <i>casei</i> <i>L.delbrueckii</i> ss. <i>delbrueckii</i> <i>L.delbrueckii</i> ss. <i>bulgaricus</i> <i>L.delbrueckii</i> ss. <i>lactis</i> <i>L.fermentum</i> <i>L.helveticus</i> <i>L.kefir</i>	<i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> , <i>L. leichmannii</i>  <i>L. yogurt</i> <i>L. caucasicus</i>
Género <i>Streptococcus</i> <i>S.salivarius</i> ss. <i>thermophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>
Género <i>Leuconostoc</i> <i>L.lactis</i> <i>L.mesenteroides</i> ss. <i>cremoris</i> <i>L.mesenteroides</i> ss. <i>mesenteroides</i>	<i>L.citrovorum</i> , <i>S.kefir</i> <i>L.cremoris</i> , <i>L.citrovorum</i> <i>L.mesenteroides</i>
Género <i>Bifidobacterium</i> <i>B.bifidum</i>	<i>Lactobacillus bifidus</i>
Género <i>Propionibacterium</i> <i>P.freudenreichi</i> ss. <i>shermanii</i> <i>P.freudenreichi</i> ss. <i>freudenreichi</i>	<i>P.shermanii</i> <i>P.freudenreichi</i>
<b>LEVADURAS</b>	
Género <i>Kluyveromyces</i> <i>K.lactis</i> var. <i>lactis</i>	<i>Saccharomyces lactis</i> , <i>K.lactis</i> <i>Kus</i> var. <i>lactis</i> ,
<i>K.marxianus</i>	<i>Saccharomyces marxianus</i> , <i>S.fragilis</i> , <i>K.fragilis</i> , <i>K.marxianus</i> var. <i>marxianus</i> <i>K.marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>
<i>K.bulgaricus</i>	
Género cándida <i>C.kefir</i>	<i>S.kefir</i> , <i>Torulopsis kefir</i> , <i>C.pseudotropicalis</i> , <i>C.macedoniensis</i> .

Fuente: Quintero et al, 1999.

## 4.2 VARIEDADES

La leche agria o acidificada producida de forma natural y espontánea fue, probablemente, uno de los primeros productos lácteos y, desde luego, el primer producto lácteo fermentado, este producto recibe multitud de denominaciones diferentes (Spreer, 1991).

Toda esta variedad se originó probablemente por las distintas exigencias climáticas y medioambientales de los microorganismos que intervienen en estos procesos. Esto a su vez indujo la aparición de productos específicos para cada región. Algunos de estos productos se han hecho famosos incluso en lugares muy lejanos de su zona de origen y se fabrican actualmente en todos los países grandes productores de productos lácteos. El más conocido es el yogur, que es originario de Bulgaria; pero también el *Koumis* y el *Kefir*, originarios del Cáucaso, gozan de una gran difusión internacional.

Estos productos según su consistencia, pueden ser geles consistentes, líquidos, batidos o bebidas (Spreer, 1991).

Existen en todo el mundo posiblemente más de 400 productos dentro de lo que podemos considerar como leches fermentadas; en este espacio se revisan unas cuantas, particularmente las leches fermentadas que tienen importancia en México (García, 2003).

Las leches fermentadas han sido utilizadas tradicionalmente como el vehículo más usual para las bacterias con características probióticas en los

humanos. Si bien, no todas las leches fermentadas han mostrado tener algún impacto en el mejoramiento de la salud, de algún modo, entre los probióticos más importantes se encuentran las bacterias lácticas, algunas de ellas se señalan en el cuadro tabla 14 (Torres, 2002).

Existe una gran variedad de productos dentro de lo que podemos considerar como leches fermentadas. El común denominador de éstos es evidentemente la fermentación láctica. La variabilidad entre los diferentes productos se debe a la flora involucrada, las características y preparación previa de la leche, las condiciones de fermentación como la temperatura y tiempo, etc.

En México se elaboran industrialmente el yogurt, que es con mucho la leche fermentada más importante, el yakult, el jocoque (que es el equivalente al buttermilk elaborado en Estados Unidos), y en menor proporción el labne o jocoque árabe. Existe también en muchos hogares la costumbre de elaborar leches fermentadas a nivel casero, ejemplo de lo anterior son el yogurt, el labne y sobre todo un producto denominado "búlgaros", que en esencia se trata del kefir(Quintero et al, 1999).

**Cuadro 14. Principales características de las leches fermentadas elaboradas en México**

Producto	Sinónimo o Producto similar	Materia Prima o tratamiento especial	Microorganismo	Temperatura de fermentación °C	Principales Productos del Metabolismo
Yogurt		Leche concentrada antes de fermentar	<i>S. thermophilus</i> y <i>L. delbrueckii</i> Subsp. <i>bulgaricus</i>	42-45	Ácido láctico, acetaldehído, acetoina, diacetilo
Yakult		Leche descremada Diluida	<i>L. casei</i>	37	Ácido láctico
Jocoque	"buttermilk"	Leche descremada o suero de mantequilla	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	22	Ácido láctico, Diacetilo
Búlgaros	Kefir	Maduración después de fermentar	Simbiosis microbiana atrapada en matriz de polisacárido:  <i>L. kefir</i> , <i>Candida kefir</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	22-25	Ácido láctico, etanol, diacetilo, acetaldehído, acetoina
Labne	Jocoque Árabe, labneh		<i>S. thermophilus</i> y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	40-42	Ácido láctico, Acetaldehído, Acetoina, diacetilo

Fuente: Torres Vitela, 2002

Desde el punto de vista nutricional y de salud, las leches fermentadas aportan nutrimentos adicionales a los del producto fresco, como son vitaminas del complejo B y una mayor cantidad de proteínas en productos

concentrados como el yogur el labne. Además, las proteínas tienen mayor valor biológico debido a la prehidrólisis que sufren por las proteasas producidas por las bacterias lácticas. También la grasa y la lactosa resultan más digeribles en estos productos que en la leche, por acción de las enzimas microbianas (Quintero et al., 1999).

### 4.3 TECNOLOGÍA APLICADA A LA ELABORACIÓN DE LECHE FERMENTADAS

Los motivos por los que las bacterias lácticas son utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración de las leches fermentadas son los siguientes:

- Su crecimiento, durante la fermentación láctica, en un abanico amplio de temperaturas haciendo posibles múltiples combinaciones microbianas dando lugar a una variedad notable de productos.

- Su capacidad para producir ácido láctico, compuestos aromáticos y polisacáridos que dan a los productos fermentados propiedades sensoriales particulares: sabor, consistencia y aroma. El ácido láctico contribuye a dar el típico sabor ácido y textura de las leches fermentadas. Los aminoácidos y los péptidos son precursores de muchas reacciones que dan lugar a compuestos aromáticos.

-Su contenido, viabilidad y actividad en la leche fermentada resultante contribuyen a la salud humana gracias a su capacidad prebiótica (Varman et al, 1994).

La tecnología aplicable es aquella que permite aprovechar los recursos metabólicos del material microbiológico que se dispone en áreas a distintos criterios:

-Organolépticos: acidez, consistencia apropiada y aroma.

-contenido de microorganismos lácticos apropiado y suficiente para desarrollar actividad probiótica en el huésped (actividad probiótica: la derivada de un aporte alimentario a base de bacterias vivas, u otros microorganismos, que afecta benéficamente al huésped y mejora su balance microbiano intestinal).

-Asepsia (respecto a microorganismos contaminantes).

La tecnología de las leches fermentadas es relativamente simple y las elaboraciones a pequeña escala sólo requieren un equipo muy sencillo. En las fabricaciones a gran escala es necesaria una producción uniforme y a bajo coste, lo que exige un mayor control y generalmente un equipo más sofisticado, aunque los principios básicos de fabricación son los mismos. Hay muchos tipos de leches fermentadas que se elaboran utilizando una tecnología parecida y, en muchos casos, las diferencias se limitan al tipo de cultivo iniciador y al contenido en sólidos totales de la leche (Varman et al, 1994).

#### 4.4 TIPOS DE LECHE FERMENTADAS SEGÚN LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Hay distintas leches fermentadas según los microorganismos utilizados. La Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) clasifica las leches fermentadas del siguiente modo:

- Las obtenidas con microorganismos termófilos(fermentación láctica entre 30 y 45°C):
  - Con un fermento único, como la leche acidófila, obtenida por *Lactobacillus acidophilus*, por ejemplo.
  - Con fermentos mixtos, como el yogur, obtenido por acción de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii subs.bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
  
- Las obtenidas por microorganismos mesófilos entre 10 y 40°C, en general fermentación láctica por debajo de 30°C):
  1. Mediante fermentación láctica, como la leche acidificada por acción de *Lactococcus lactis* y sus subsp.. y/o *Leuconostoc mesenteroides* y sus subsp..
  2. Mediante fermentación láctica y alcohólica, como el Kéfir(*streptococcus casei*, *S.lactis*, *S.cremoris*,*s.diacetyllactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Candida cefir*, *Kluyveromyces lactis*, etc) o el koumis(*Lactobacillus delbrueckii subs.bulgaricus* y *kluyveromyces marxianus*, etc).

Todas las bacterias lácticas utilizadas en lechería son Gram + a excepción del género *Acetobacter*. Facultativamente son anaerobias, no forman esporas, producen ácido láctico, toleran un pH bajo, no reducen los nitratos, no pueden producir ATP por transferencia de electrones. Las bifidobacterias se suelen utilizar asociadas a las bacterias lácticas. También se utilizan levaduras (kéfir, koumis).

#### 4.4.1 YOGUR

El yogur es el producto acidificado y coagulado que se obtiene a partir de la leche por fermentación con bacterias productoras de ácido láctico. El yogur es la más conocida de todas las leches fermentadas y la de mayor consumo a nivel mundial (Early, 1998).

Se cree que el yogur es originario de los Balcanes y países mediterráneos del este, en donde se elabora a partir de leche entera de vaca, cabra y oveja, según la disponibilidad.

El yogur es un producto lácteo fermentado que resulta del crecimiento de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Streptococcus salvarius* subs. *thermophilus* en leche. De esta fermentación debe resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y delicado, de textura firme, con la mínima sinéresis y con sabor característico (Quintero et al, 1999).

El sabor, la textura y el aroma del yogur varían dependiendo del país de origen (y de otros factores como la formulación de la preparación y el proceso de fabricación) (Early, 1998).

Los métodos de fabricación varían considerablemente en los distintos países según la materia prima utilizada, el volumen de producción, la formulación del producto y el tipo de yogur que se desea obtener.

#### 4.4.1.1 TIPOS DE YOGUR

Existen tres tipos principales de yogur: firme, batido y líquido, aunque se pueden mencionar algunos otros como congelado, deshidratado, etc. (Quintero et al, 1999).

- a) Yogur firme. Gel consistente y solidificado en el envase que habitualmente se extrae del envase o se consume con ayuda de una cuchara (Speer, 1991).
- b) Yogur batido. Gel que después de cuajado se ha troceado cuidadosamente, se ha enfriado y se ha envasado, y que ya en el envase experimenta un incremento de su viscosidad, lo que hace que pueda presentar nuevamente una consistencia casi firme.
- c) Yogur líquido. Como el yogur batido, sólo que antes de envasado se transforma por homogenización en un líquido que se puede consumir en forma de bebida.

## INGREDIENTES

### Leche

El yogur se puede obtener a partir de la leche de todas las especies y aunque las más comunes son la vaca, la cabra y la oveja, también se han utilizado las leches de camella y búfala (Varman et al, 1994).

La leche puede ser:

- Leche entera;
- Leche desnatada;
- Leche concentrada desnatada;
- Leche en polvo desnatada;

En la formulación de los yogures desnatados y de bajo contenido graso, los principales ingredientes son la leche desnatada o leche concentrada desnatada. El contenido en sólidos lácteos no grasos se ajusta añadiendo leche en polvo desnatada o agua, dependiendo de que haya que aumentarlo o reducirlo (Early, 1998).

Por lo general, la leche se modifica, ya sea por la adición de leche descremada en polvo u otros sólidos de leche como caseínatos, o por concentración mediante el proceso de evaporación normal con un solo efecto, por ósmosis inversa o por ultra filtración (la cual sólo concentra las proteínas disminuyendo así el contenido de lactosa y sales). El propósito de tal modificación es mejorar la firmeza del producto y darle al gel una mayor resistencia a los daños mecánicos, evitando así el desuerado durante el

manejo normal del yogur. El contenido de sólidos no grasos de leche en yogur es variable, pero nunca debe ser menor de 8.5% de lo contrario el producto puede tener una consistencia demasiado suave y una estructura del gel muy débil (Quintero et al, 1999).

El contenido de grasa, adecuadamente homogenizada tratándose de yogur entero, tiene también una importante contribución en la viscosidad, textura y apariencia del producto y coadyuva a evitar la sinéresis. El Codex Alimentarius especifica un contenido de grasa mínimo de 3.4 para el producto entero y menor de 0.5% para el yogur descremado.

### **Edulcorantes**

Los edulcorantes se pueden incorporar al yogur con los concentrados de fruta o directamente en la preparación inicial.

Los edulcorantes se añaden para contrarrestar la acidez desarrollada durante la fermentación, especialmente en la elaboración de yogures con frutas muy ácidas o que contienen poco azúcar, como las grosellas o las fambruesas (Early, 1998).

La cantidad de edulcorantes a utilizar, depende de muchos factores, como por ejemplo:

- El tipo, cantidad y acidez de la fruta añadida;
- El compuesto edulcorante empleado;

- Las preferencias de los consumidores;
- Aspectos económicos;
- Exigencias legales;
- Efectos inhibidores sobre los microorganismos del cultivo iniciador.

Aunque la sacarosa y la glucosa son los edulcorantes más frecuentes, también pueden añadirse otras sustancias como maltosa, galactosa y fructosa.

Los edulcorantes sintéticos se utilizan en la formulación de los yogures bajos en calorías y los más empleados son el aspartame, el ciclamato y la sacarina (Early, 1998).

### **Estabilizantes**

Los estabilizantes y agentes espesantes más utilizados en la elaboración del yogur son almidones naturales; alginatos, agar, carragenina, gomas comestibles, pectinas y celulosas. Las principales funciones que desempeñan, son:

- Mantener la viscosidad durante el proceso de elaboración y mejorarla en el producto final;
- Modificar la estructura y la textura;
- Evitar la separación del suero, especialmente durante el almacenamiento y transporte;
- Facilitar la suspensión de las partículas de fruta. También pueden influir sobre la cremosidad y untuosidad del producto.

El tipo y proporciones de estabilizantes a añadir son decisión de cada fabricante, el uso de estos aditivos en concentraciones superiores al 0.3% pueden tener efectos adversos en el sabor (Early, 1998; Quintero et al, 1999).

Para obtener los óptimos resultados, cuando se seleccionan los estabilizantes es necesario tener en cuenta sus características de solubilidad, velocidad de disolución, solidificación y estabilidad a la temperatura. Estos factores, entre otros, deben considerarse detenidamente para calcular la cantidad correcta de estabilizantes que es necesario añadir, porque si la concentración es demasiado baja, no ejercen sus propiedades funcionales y, si es excesivamente alta, pueden dar lugar a la aparición de defectos de aspecto y textura (sensaciones extrañas en la boca, brillo superficial, consistencia gomosa).

### **Preparaciones de frutas**

Los yogures de frutas se elaboran con mermeladas, jarabes, pulpas, o con fruta fresca o congelada; pero en cualquier caso debe haber sido tratada térmicamente para evitar contaminaciones con hongos y levaduras. La fruta puede añadirse en el fondo del envase para la elaboración del yogur firme o puede mezclarse con el producto para la elaboración del yogur tipo batido o líquido (Quintero et al, 1999).

## Conservadores

En la fabricación del yogur están permitidos varios conservantes diferentes que pueden añadirse directamente a la leche o que muchas veces se incluyen en los purés de fruta. Los más empleados son el sorbato de potasio, el benzoato sódico y el dióxido de azufre.

## Microbiología de la fermentación

La función de cualquier fermento o cultivo iniciador es producir suficiente cantidad de ácido láctico en el menor tiempo posible, haciendo descender el pH de la leche desde 6.4-6.7 (dependiendo de la riqueza en extracto seco) hasta un pH de 3.8-4.2 y además desarrollar en el producto final unas características de textura, viscosidad y sabor (Early, 1998).

Muchas veces, la elección del cultivo iniciador que se utiliza para fabricar las leches fermentadas está basada en la tradición. El tipo de fermento no sólo es importante para las características de un producto determinado, sino también determina las diferentes variedades de ese producto.

Los cultivos comerciales más utilizados están compuestos por *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* y los productos "bio" contienen además especies de *Bifidobacterium*. Entre otros microorganismos empleados se encuentran *Lactobacillus delbreckii ssp. Lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus helveticus*.

En los últimos años ha empezado a utilizarse bifidobacterias como *Bifidobacterium bifidum, infantis, breve, longum y adolescentis*, con la finalidad de evitar la acidificación excesiva de los productos fermentados y potenciar sus efectos beneficiosos para la salud (Early, 1998).

La inclusión de bifidobacterias entre los microorganismos fermentadores, obliga a prolongar el tiempo de incubación de la leche fermentada y se obtiene un producto con un pH más alto (pH 4.4-4.5) que el del yogur tradicional (Early, 1998).

#### 4.4.1.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

Partiendo de leche clarificada y concentrada, el primer paso en la manufactura de este producto es la pasteurización. Esta operación tiene como objeto eliminar la flora asociada a la leche, dejando así un medio adecuado para el cultivo de las bacterias del yogur, libre de competidores y microorganismos indeseables (Quintero et al, 1999). En el cuadro 15 se presenta el proceso de elaboración de yogur.

Existe una amplia gama en las condiciones de pasteurización: en procesos por lotes se reportan condiciones que varían de 70 a 90°C de 5 a 45 minutos, o en procesos continuos en intercambiadores de calor tubulares o de placas, se reportan temperaturas de 80°C a 95°C durante 10 a 40 minutos. Un calentamiento insuficiente puede resultar en un yogur con cuerpo débil, mientras que un sobrecalentamiento ocasiona un producto con textura granular, fuerza de gel débil y tendencia a que el suero se separe.

La homogenización puede efectuarse antes o después de la pasteurización y generalmente se hace a temperaturas de alrededor de 60°C y presiones de 2.6 a 6.8 Kpa(1000-3000 psi)(Quintero et al, 1999).

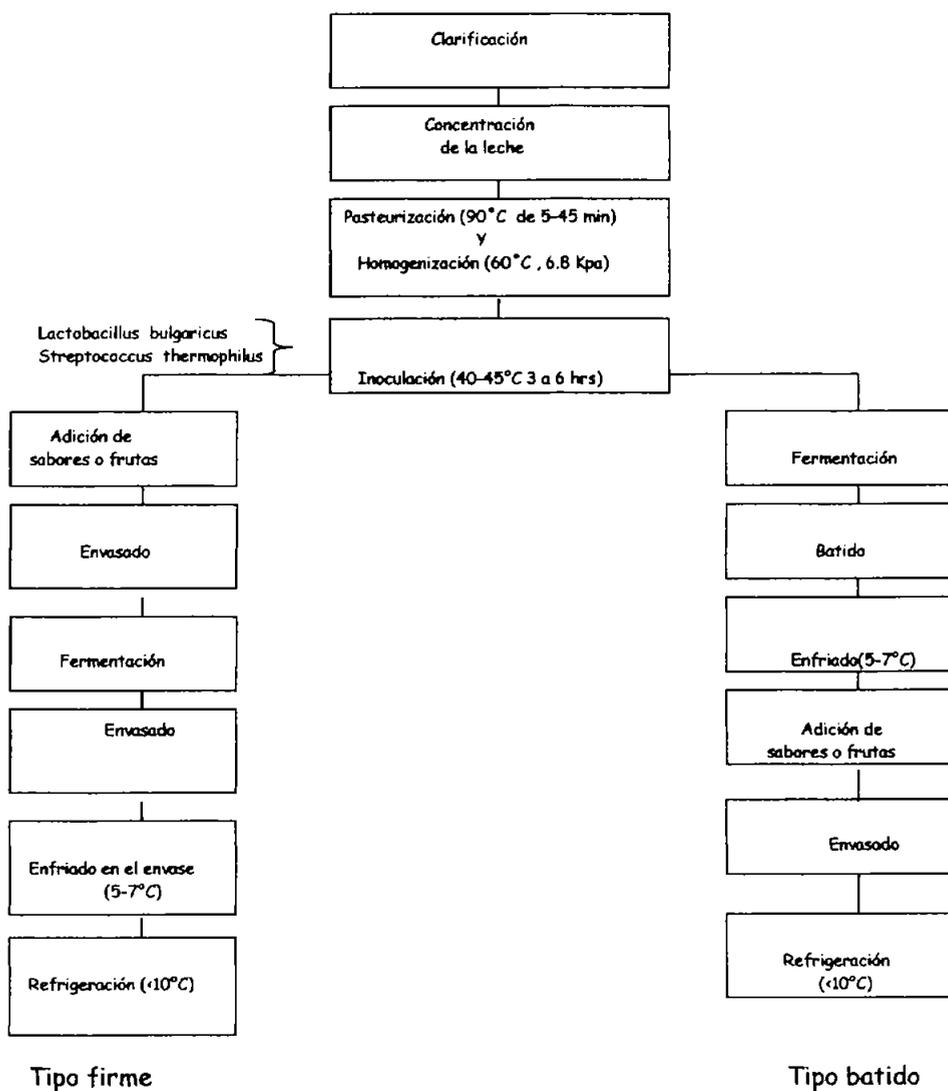
Para la fermentación, la leche se lleva a una temperatura de 40-45°C y se inocula con 2 a 5% de un cultivo compuesto de una mezcla con relación uno a uno de *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*. La leche se incuba a esta temperatura de 3 a 6 horas, y el producto alcanza acidez entre 0.8 y 1.4% de ácido láctico y un pH entre 3.7 y 4.6. La incubación se efectúa en el envase de distribución en el caso del yogur firme o semisólido y en tanques para el yogur batido y líquido.

En el primer caso la temperatura de los envases se controla mediante baños con agua o gabinetes con aire con temperatura controlada, por lotes o en túneles con bandas en procesos semicontinuos. En el segundo caso la fermentación se efectúa a granel en tanques provistos de paletas que deberán romper y agitar delicadamente el coágulo al final de la fermentación (Quintero et al, 1999).

Finalmente el producto se enfría entre 5°C a 7°C, temperatura a la cual la fermentación se detiene y el producto se acidifica ya muy poco. El enfriamiento se hace, en el caso de yogur firme, dentro del envase mediante baños con agua o con corrientes de aire frío, y en el caso del yogur fermentado a granel, en el mismo tanque de fermentación o en forma más rápida, con cambiadores de calor tubulares o de placas.

Los productos resultantes son: en el caso de la fermentación en el envase, un yogur de consistencia rígida, con la apariencia de un gel semisólido, que puede tener colorantes y saborizantes añadidos antes de la fermentación, e incluso fruta, la cual se adiciona en el fondo del envase también previo a la formación del coágulo. En el caso del yogur batido, llamado también tipo suizo o continental, una vez roto y agitado el coágulo debe obtenerse un producto de consistencia cremosa y uniforme, al cual se pueden añadir saborizantes, colorantes y/o frutas (Quintero et al, 1999).

Fig.8. Diagrama de la elaboración del yogur



Fuente: Quintero et al, 1999.

#### 4.4.2 KEFIR

El kefir es la más conocida de las leches fermentadas ácido-alcohólicas. Elaborado tradicionalmente en el Cáucaso a partir de leches de diferentes especies (vaca, oveja, cabra), en la actualidad el Kefir se fabrica de forma industrial en algunos países, fundamentalmente en la Unión Soviética, en donde este producto es la leche fermentada más popular (Bourgeois et al, 1995).

El kefir es una bebida fermentada que ha consumido por miles de años. Su uso está extendiéndose actualmente por sus propiedades organolépticas únicas y su larga tradición en beneficios en la salud (Saloff-coste, 1996).

El nombre de "búlgaros" se da en nuestro país a una leche que se elabora en casa y con una arraigada tradición que data de por lo menos el siglo XIX (García, 2000).

Existen dos tipos de kefir: dulce, agua fermentada endulzada; y lácteo, una bebida de leche fermentada (Saloff-Coste, 1996).

#### **Definición**

El kefir es un producto lácteo fermentado obtenido con un cultivo de kefir y con leche fresca pasteurizada, normalizada en su contenido de grasa o desnatada, mediante un proceso de fermentación láctica y, en menor grado, de un proceso de fermentación alcohólica(Spreer, 1991).

Este producto resulta de la fermentación de la leche con una mezcla muy singular de bacterias lácticas y levaduras de distintas especies. El inóculo utilizado en la elaboración del kefir es muy singular: se trata de una simbiosis de microorganismos atrapados en una matriz de polisacárido, lo cual forma masas del tamaño de granos de arroz o más grandes que reciben el nombre de "granos de kefir" así, el inóculo se encuentra literalmente retirándolo por filtración de la leche fermentada para volver a usarlo en el siguiente lote. La matriz está formada por un polisacárido de glucosa y galactosa que recibe el nombre de kefirano; 24% está constituido por carbohidratos y 13% por proteína (Saloff-Coste, 1996; Quintero et al, 1999; García, 2000).

Debido a la presencia de bacterias lácticas y levaduras, en esta leche se produce tanto acidez como cantidades moderadas de alcohol y gas ( $CO_2$ ), y aromas de mantequilla, yogur y otros que le dan su sabor característico. El inóculo utilizado en la elaboración del kefir permite su reutilización retirándolo por filtración de la leche fermentada para volver a usarlo en el siguiente lote.

El origen de estos granos se desconoce; los intentos por producirlos a partir de diferentes microorganismos aislados que los forman han sido infructuosos (García, 2000).

#### 4.4.2.1 GRANOS DE KEFIR

El kéfir sólo puede hacerse de granos de kéfir y de cultivos madre preparados de los granos. Los granos se forman en el proceso de fabricación del kéfir y sólo de granos pre-existentes (Saloff-Coste, 1996).

En los últimos años se han investigado con detalle la naturaleza de los granos de kefir. Son gránulos gelatinosos de 2-15mm de diámetro. Los granos incluyen principalmente bacterias ácido lácticas (Lactobacilos, Lactococos, Leuconostoc) y levaduras, y bacterias ácido acéticas y posiblemente otros microorganismos (Varman et al, 1994; Saloff-Coste, 1996).

Los microorganismos presentes son variables, pero pueden incluir *L.lactis* ssp *lactis* y ssp *cremoris*, *Lb acidophilus*, *Lb kefir*, *Lb kefiranofaciens*, *Lb casei*, *Candida kefir*, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* y especies de *Saccharomyces* como *Saccharomyces.cervisiae*. En condiciones de sub-cultivo regular, los granos se multiplican en la leche durante muchas generaciones sin que se modifiquen sus características ni sus propiedades (Varman et al, 1994).

En el cuadro 15 presenta los tipos de microorganismos encontrados en los gránulos de kefir.

La matriz se dispone en estructuras de capas concéntricas en las que están atrapados los lactobacilos productores de kefiran. Los lactobacilos que no producen kefiran y las levaduras, se disponen predominantemente en las zonas externas. *Lb kefiranofaciens* produce kefiran en el centro del grano, donde el crecimiento está favorecido por las condiciones de anaerobiosis y

la presencia de etanol. Por lo tanto, *Lb kefiranofaciens* es responsable de la propagación de los granos que no se produce en ausencia de este organismo, aunque los granos que no se propagan mantienen su capacidad de producir kefir. El lactobacilo más común en el kefir, *Lb kefir*, se encuentra sólo en pequeño número en la superficie de los granos (Varman et al, 1994).

Estas formaciones tienen estructura de red y presentan una proporción aproximada de extracto seco del 10%. El extracto seco se compone principalmente de hidratos de carbono ( $\approx 56\%$ ) y de proteínas ( $\approx 32\%$ ) (38).

Las levaduras son las responsables de la producción de alcohol y  $CO_2$ . Las bacterias son las responsables de la acidificación (Spreer, 1991).

**Cuadro 15. Microorganismos encontrados en el kefir.**

Microorganismo	Especies frecuentemente encontradas	Características/Función
Lactobacilos	Heterofermentativas: <i>Lb.brevis</i> , <i>Lb.kefir</i> .	<i>Lb.kefir</i> , predominante en la bebida (80% de lactobacilo: $8 \times 10^7$ cfu/ml), una minoría en el grano (10% de la población: $9 \times 10^7$ cfu/g)
	Homofermentativas: <i>Lb.paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> , <i>Lb.plantarum</i> , <i>Lb.acidophilus</i> , <i>Lb.delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb.kefiranoferens</i> .	Predominante en el grano del kefir (90% de la población: $10^9$ cfu/g) y representada solo en un 20% de los lactobacilos en la bebida ( $2 \times 10^7$ cfu/ml).
Lactococos	<i>Lc.lactis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Lc.lactis</i> spp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>LC.lactis</i> spp. <i>cremoris</i> .	Aislados de granos y bebida en varias concentraciones ( $10^8$ a $10^9$ cfu/ml en la bebida).  Provee de una acidez rápida desarrollada durante las primeras horas de fermentación.  Inhibidas a altos niveles de acidez.
Leuconostoc	<i>Ln.mesenteroides</i> spp. <i>mesenteroides</i> , <i>Ln.mesenteroides</i> spp. <i>dextranicum</i> , <i>Ln.mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i> , <i>Ln.lactis</i>	Frecuentemente citadas como lactococos, aisladas de los granos de kefir y la bebida.  Contribuye al sabor y aroma del kefir.
Streptococos	<i>S.thermophilus</i> ,	Raramente citado.
Bacterias ácido acéticas	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter rasens</i> .	Juega un papel importante en mantener la simbiosis de la microflora de los granos de kefir.  Mejora la consistencia del kefir incrementando su viscosidad.
Levaduras	Levaduras no fermentadoras de lactosa: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> .	Población de levaduras: $10^5$ a $6 \times 10^7$ cfu/g en el grano, $2 \times 10^4$ a $7 \times 10^5$ cfu/ml en la bebida.
	Levaduras fermentadoras de lactosa: <i>Candida kefir</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i> .	Juega un importante papel promoviendo la simbiosis entre los microorganismos. Responsable de la formación de $CO_2$ , contribuyen a las características de sabor y aroma.

Fuente: Spreer, 1991, Saloff-Coste, C, 1996

#### 4.4.2.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

Existen varios métodos de producción del kefir: el método tradicional y el método reciente (Saloff-Coste, 1996).

Para la elaboración del kefir se parte de leche de vaca, entera o descremada, o de cabra o borrega, e incluso se puede elaborar con mezclas de leche y suero de leche (Quintero et al, 1999).

##### 4.4.2.2.1 PROCESO TRADICIONAL

La materia prima del kefir es generalmente la leche entera que se pasteuriza (85°C-95°C durante 5 minutos) para desnaturalizar las proteínas del suero. Las propiedades hidrofílicas de estas proteínas desnaturalizadas mejoran la viscosidad del producto final lo mismo que el proceso de homogenización empleado frecuentemente. Una parte de la leche que va a procesarse puede emplearse también para preparar el inóculo y debido a la naturaleza del "cultivo iniciador" es indispensable mantener estrictas medidas de higiene (Bourgeois et al, 1995; Quintero et al, 1999; García, 2000).

Así la fase inicial de preparación del cultivo implica la inoculación de la leche pre-tratada con granos de kefir y después la incubación de la mezcla a unos 23°C aproximadamente. Transcurridas unas 20 horas los granos se separan de la leche por filtración y se lavan cuidadosamente en agua fría antes de

volver a emplearlos (Saloff-Coste, 1996; Quintero et al, 1999; García, 2000).

Los granos crecen en el proceso de la producción del kefir y son reutilizados para subsecuentes fermentaciones. Los granos pueden ser secados y mantenidos a temperatura fría (4°C). Para un periodo más largo de conservación pueden ser liofilizados o congelados (Varman et al, 1994; Saloff-Coste, 1996).

La leche restante constituye el iniciador final para la fermentación a escala comercial y se adiciona a la leche a procesar a una concentración del 3-5%, llevándose a cabo la fermentación también a 20-25°C durante 20h. A continuación el kefir se mantiene durante varias horas, tiempo durante el que el coágulo se estabiliza (madura), hasta el producto final que contiene el 0.9-1.1% de ácido láctico y el 0.5-1% de etanol, contiene además diacetilo, acetaldehído y acetoina, los cuales son muy importantes para el sabor característico. En algunos países existen productos a base de kefir con sabores de frutas (Saloff-Coste, 1996; Quintero et al, 1999; García, 2000).

Esta última fase permite la máxima estabilidad del coágulo y la etapa final de envasado debe diseñarse de forma tal que el daño mecánico del producto sea mínimo (Bourgeois, 1995).

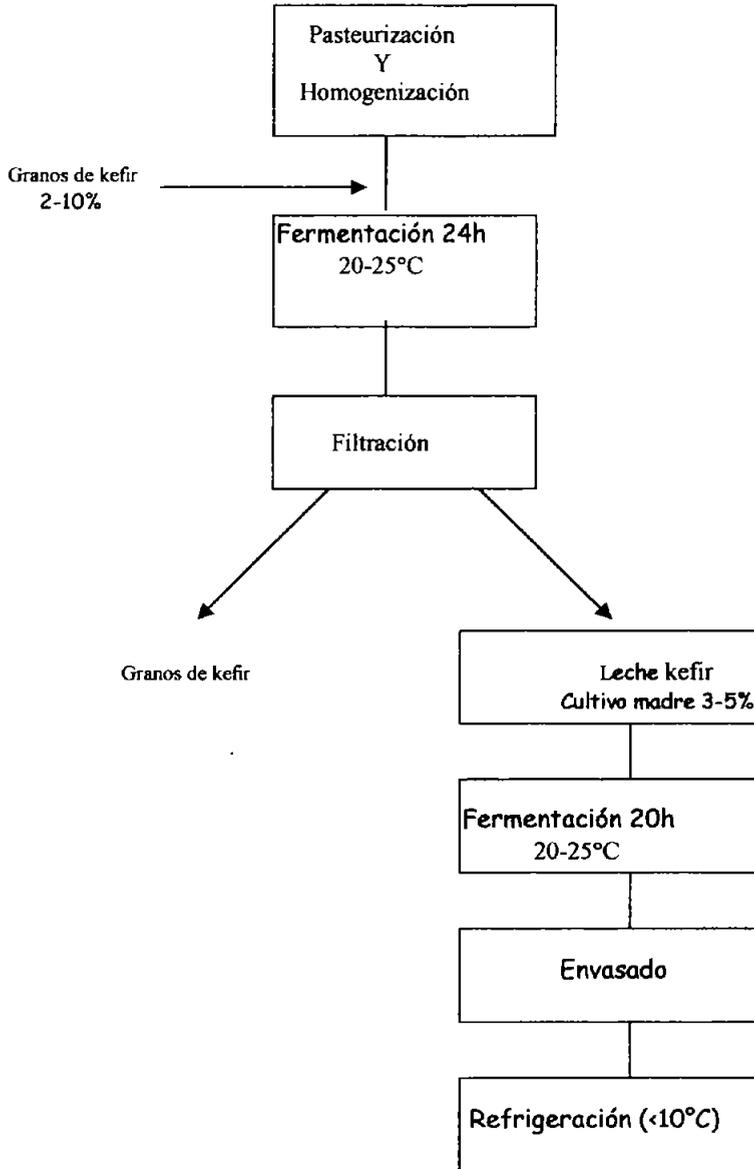
Varios problemas asociados con el kefir tradicional han llevado a un método más moderno de producción. El método tradicional produce volúmenes

pequeños de kefir, y requiere varias etapas, cada etapa adicional aumenta el riesgo de contaminación (Saloff-Coste, 1996).

#### 4.4.2.2 PROCESO RECIENTE

Para resolver las dificultades anteriores, algunos productores han comenzado a utilizar cultivos liofilizados concentrados hechos de los granos. Estos cultivos madre son usados como cultivos estarter para inoculación directa en la leche. Más control sobre el proceso y menos pasos proporcionan una calidad más consistente (Saloff-Coste, 1996).

Fig. 9. Diagrama de elaboración de kefir



Fuente : Saloff-Coste, 1996

#### 4.4.3 YAKULT

El yakult es una leche fermentada originaria de Japón que ha tenido también éxito en otros países como México. Su consumo obedece fundamentalmente a las pretendidas razones benéficas para salud. La información sobre la tecnología de estos productos es muy escasa: la leche de fabricación contiene pocos sólidos, solamente el 1.1% de grasa, el 1.2% de proteína y el 1.1% de lactosa, aunque se añaden otros carbohidratos en una concentración del 14%. Se elabora a partir de leche descremada diluida, la cual se fermenta con *Lactobacillus casei subsp.casei* y *Bifidobacterium bifidum*, ambas implantables en el tracto gastrointestinal. El producto tiene una consistencia muy líquida y contiene azúcar y saborizantes, lo cual junto con los metabolitos de la fermentación le confieren un sabor característico muy agradable. La fermentación se efectúa a 37°C durante 4 días y se obtiene una acidez tan alta como 2.7% de ácido láctico (Varman et al, 1994; Quintero et al, 1999).

El Yakult Miru-Miru se obtiene a partir de leche de composición similar a la leche entera de vaca pero con azúcares adicionales hasta el 6.1%. La leche fermenta por la acción de una mezcla de *B.bifidum*, *B.breve*, *Lb. acidophilus* y *Lb.casei subsp.casei* (Varman et al, 1994).

##### 4.4.3.1 PROCESO DE ELABORACIÓN

La bebida Yakult es elaborada a partir de leche descremada en polvo, glucosa (dextrosa) y sacarosa. Esta mezcla es fermentada por el *Lactobacillus casei* cepa Shirota. Al término del proceso, la leche

fermentada es mezclada con concentrados naturales de frutas (esencias de naranja y limón). El sabor característico de la bebida Yakult esta determinado por los concentrados naturales de frutas y el ácido láctico producido por los lactobacilos durante la fermentación.

Yakult es una bebida láctea fermentada que contiene más de ocho mil millones de lactobacilos vivos ( $1 \times 10^8$  UFC/ml ), que además de contribuir al desarrollo del sabor, son capaces de llegar vivos al intestino delgado.

El producto final es envasado en frascos de poli estireno (un tipo especial de plástico que no guarda olores ni altera el sabor) La tapa de aluminio, esta recubierta en su parte inferior con una película termo adherente que evita el contacto del líquido con la tapa. En la cual se imprime la fecha de caducidad, la cual oscila alrededor de 30 días después de la fecha de envasado. Los frascos se llenan con 80 ml de Yakult.

### **Conteo de lactobacilos**

El conteo de lactobacilos es una medida del número de bacterias lácticas en una muestra. Para ser determinado el número de estos lactobacilos, una muestra es sembrada en un medio de cultivo y el número de colonias formadas se expresa como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).

El conteo de lactobacilos indica el número de *L. casei* Shirota en el producto. La dilución de la muestra nos permite contar el número de bacterias en alrededor de 100,000,000 igual a ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) esto es, que en cada mililitro de Yakult existen al rededor de 100,000 000 lactobacilos por lo que

cada frasco de Yakult contiene un mínimo de 8 mil millones de *Lactobacillus casei* Shirota vivos.

#### 4.4.4 LECHE BIFIDUS

El productos es nombrado acuerdo con la bacteria usada en la fermentación (*Lactobacillus bifidus*) es producida en pequeñas cantidades en algunos países Europeos, su consumo esta enlazado a su valor terapéutico que a sus propiedades sensoriales.

El proceso de elaboración de leche bifidus involucra la estandarización de la leche con el contenido de grasa, aumento del contenido de proteína, homogenización y tratamiento térmico a 85-120°C por 5-30min. La leche es inoculada con 10% de un cultivo iniciador, y encubada a 37-41°C hasta que ocurre la coagulación, seguida por enfriamiento.

El producto final tiene un pH de 4.3-4.7 y contiene  $10^8$ - $10^9$  de bifidobacterias viables por mL, esta concentración declina a dos log durante la refrigeración en un periodo de 1-2 semanas de almacenamiento (Macrae et al, 1993; Robinson et al,2000).

#### 4.4.5 BIOGHURT, BIOGARDE Y BIFIGHURT

Son leches fermentadas elaboradas con los siguientes iniciadores: *Streptococcus thermophilus*, *L.acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* los microorganismos crecen inicialmente como monocultivos, por el uso del inoculo de 10-20%, el tiempo de acidificación son más cortos .

### *Bifihurt*

Es elaborado por la fermentación con un cultivo iniciador con *Bif. Longum* y *Streptococcus thermophilus* al 6% a una temperatura de 42°C durante 4hrs. El producto tiene un pH de 4.7, puede contener  $10^7$  *Bif.longum* por ml (Macrae et al, 1993; Robinson et al,2000).

### *Biogarde*

Es obtenido por la fermentación con un cultivo iniciador con *Bif. bifidum*, *L. acidophilus* y *St. thermophilus*.

La elaboración involucra la estandarización de la leche, homogenización y tratamiento térmico(90°C por 10 min. o 95°C por 5 min.), inoculación con cultivo iniciador (6%) a 42°C durante 3-4hrs hasta la coagulación seguido de un enfriamiento (Macrae et al, 1993; Robinson et al,2000).

### *Bioghurt*

Es elaborado por la fermentación con *Streptococcus thermophilus* y *L. acidophilus*. a una concentración de 10-20%.

#### **4.4.6 YOGURT BIFIDUS Ó YOGURT ACIDOPHILUS**

La combinación con cultivos de bacterias de yogur con bifidobacterias y la adición de *L.acidophilus* ha desarrollado productos los cuales tienen un sabor característico.

El primer tipo de yogur es elaborado por una fermentación simultánea de la estandarización, tratamiento térmico, homogenización de la leche con un cultivo iniciador conteniendo cultivos de yogur y bifidobacterias (5-10%) a 40-42°C hasta la coagulación seguido del enfriamiento.

El segundo tipo es elaborado por una fermentación simultánea del tratamiento térmico de la leche con cultivos de *Bif. Bifidum* y/o *bif. Longum* y /o *bif. Infantis*, *L. acidophilus* y microorganismos de yogur. Estos productos tienen un sabor suavemente ácido, el cual puede ser modificado con fruta (Macrae et al, 1993; Robinson et al, 2000).

Varios productos lácteos se comercializan por contener bacterias probióticas, sin embargo, el más encontrado ampliamente es el yogur, no es raro leer en la etiqueta de esos productos, que se elaboraron con cultivos incluyendo *Lactobacillus acidophilus* o especies de bifidobacterias, es importante que los cultivos probióticos usados contribuyan a buenas propiedades sensoriales. Estos dos cultivos no son los cultivos que han sido tradicionalmente usados en la fabricación del yogur. Los cultivos iniciadores tradicionales incluyen *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (Sanley et al, 2000).

En la industria láctea se sabe que existe variación entre las cepas y especies de cultivos iniciadores con respecto a su habilidad de producir los cambios deseados en la leche al fermentarse. Así, no debe ser sorprendente que hubiera variación entre las cepas y especies de microorganismos probióticos

con respecto a su habilidad de producir acción inhibitoria hacia los microorganismos patógenos. Además, no se debe esperar que una cepa o especies de microorganismos probióticos proporcionen todo los beneficios potenciales que podrían ser posibles del consumo de estos organismos (Stanley et al, 2000).

CAPÍTULO V  
TRATAMIENTOS TÉRMICOS

## CAPITULO V

### TRATAMIENTOS TERMICOS APLICADOS A LECHE FERMENTADAS

Los productos lácteos fermentados que contienen bacterias vivas deben conservarse en frío para garantizar la presencia de los fermentos vivos y los beneficios vinculados a ellos a lo largo de toda su vida comercial. Las bacterias lácticas adormecidas por la cadena de frío despliegan no obstante una actividad residual: la acidificación y la proteólisis prosiguen, si bien a un ritmo atenuado, y por ese motivo las características del producto se modifican y no pueden garantizarse más allá de una vida útil por lo general bastante breve (Abou, 2000).

Existen dos tipos de tratamiento térmico que permiten prolongar dicha vida útil: la termización y la congelación. La termización de la leche fermentada, aún siendo moderada, provoca una pérdida de fermentos vivos y una degradación de los beneficios aportados por el producto, especialmente su efecto positivo sobre la digestión de la lactosa en las personas con déficit de lactasa. Si bien la congelación de la leche fermentada ha sido objeto de menos estudios, este procedimiento parecería tener menos efectos negativos, siempre y cuando se tomen ciertas precauciones en la elección de los fermentos, en la formulación y en el proceso de fabricación (Abou, 2000).

La leche fermentada en general, y el yogur en particular, tienen la característica de contener microorganismos vivos que les confieren propiedades organolépticas y nutricionales, así como efectos benéficos sobre la salud. Pero

la presencia de estos microorganismos también exige que se respeten algunos imperativos de conservación y de fecha de consumo: para garantizar a los consumidores todos los beneficios, los productos fermentados deben someterse a la cadena de frío a lo largo de toda su vida útil. El tratamiento a temperatura elevada, o termización, que reduce la población de bacterias lácticas, elimina estas exigencias y permite prolongar el período de consumo. No obstante, el impacto de las altas temperaturas no se limita a la viabilidad de los fermentos sino que conlleva la disminución, e incluso la supresión, de algunos efectos benéficos específicos (Abou, 2000).

Otro tratamiento térmico aplicado a los productos fermentados, la congelación, permite diversificar las formas de consumo de la leche fermentada; también en ese caso, las temperaturas aplicadas provocan algunos cambios en las características de los productos.

## 5.1 LA CADENA DE FRÍO

### Principio de la cadena de frío

Cuando culmina el período de fermentación, el yogur ya ha adquirido el grueso de sus características nutricionales y organolépticas, a saber, una población de bacterias de al menos  $10^8$  bacterias lácticas/g y una concentración de ácido láctico de entre 7 a 12 g/l. En ese preciso momento comienza la cadena de frío: la temperatura disminuye rápidamente a  $5^{\circ}\text{C}$  para detener la fermentación y evitar la sobre acidificación; de ahí en adelante, el producto debe mantenerse a ese nivel hasta la fecha límite de consumo, con el fin de conservar todas sus características (Abou, 2000).

A esa temperatura, la actividad de las bacterias lácticas se reduce considerablemente, ya que se aminora su ritmo de vida y su cantidad permanece estable. Cualquier interrupción de la cadena de frío podría provocar un aumento de la actividad de las bacterias, cuya consecuencia sería una modificación del sabor del yogur (acidez, amargor) o de su consistencia (decantación, aparición de suero láctico) (Abou, 2000).

### 5.1.1 VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS A LO LARGO DE LA CADENA DE FRÍO

Para conservar las bacterias lácticas vivas en el yogur, la cadena de frío debe satisfacer una norma aplicada al par temperatura/plazo de conservación. En Francia, dicha norma es de 28 días a un máximo de 6° C, al cabo de los cuales se define la fecha límite de consumo (FLC). En España es también de 28 días pero a una temperatura de entre 1° C y 8° C. La FLC garantiza al consumidor que el producto es apto para el consumo desde un punto de vista nutricional, organoléptico, sanitario y de los beneficios sobre la salud, y que contiene una población de bacterias de 10<sup>8</sup> UFC (unidades formadoras de colonias)/g de producto.

Debido a la actividad residual de las bacterias lácticas a 4° C, la acidez del producto aumenta lentamente, afectando de forma progresiva la viabilidad de las bacterias. Dicha actividad se intensifica cuando la temperatura de conservación supera los 4° C (Abou, 2000).

La viabilidad de los fermentos lácticos en medio ácido a baja temperatura depende de las especies bacterianas y, dentro de una especie determinada, varía según las cepas.

Generalmente, las cepas utilizadas han sido seleccionadas por su capacidad para sobrevivir en esas condiciones por lo menos hasta la FLC. Los fermentos específicos del yogur, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, presentan buenas aptitudes para sobrevivir en esas condiciones: la población de *S. thermophilus* no decrece de manera significativa cuando se lo conserva a 4° C, y, a igual temperatura, la de *L. bulgaricus* decrece en diversos grados según las cepas, pudiendo comenzar a disminuir a partir del quinto día o a partir del decimocuarto día. La población de *Lactobacillus acidophilus* y de *Bifidobacterium* decrece de modo constante, especialmente la de *Bifidobacterium bifidum*, que puede empezar a reducirse a partir del quinto día ( ver cuadro 17) (Abou, 2000).

Resulta difícil establecer una regla general sobre la supervivencia de las distintas especies de bacterias lácticas, ya que existe una gran variación entre las distintas cepas, como lo demuestran los ejemplos que figuran a continuación en el cuadro 16a y 16 b.

Cuadro 16a. Evolución de las características de un yogur con dos fermentos diferentes en función de la temperatura de conservación

Fermento 1 postacidificante

Conservación a 4°C			Conservación a 10°C		Conservación a 25°C	
Días*	PH**	Acidez °D	PH**	Acidez °D	PH**	Acidez °D
1	4.46	105	4.28	115	4.10	129
7	4.07	134	3.95	139	3.68	181
14	4.00	146	3.88	147	3.64	196
21	3.96	150	3.83	156		
28	3.90	155	3.80	157		
<i>S. thermophilus</i> $2.4 \times 10^8$ ufc/ml <i>L. bulgaricus</i> $3.8 \times 10^8$ ufc/ml (28 días)			<i>S. thermophilus</i> $2.0 \times 10^8$ ufc/ml <i>L. bulgaricus</i> $2.8 \times 10^8$ ufc/ml (28 días)		<i>S. thermophilus</i> $2.0 \times 10^8$ ufc/ml <i>L. bulgaricus</i> $1.5 \times 10^8$ ufc/ml (7 días)	

\*Días tras la fermentación

\*\*Fermentación detenida en pH 4.6 en todos los casos

Fuente: Abou, C, 2000.

Cuadro 16b. Evolución de las características de un yogur con dos fermentos diferentes en función de la temperatura de conservación

Fermento 2 poco postacidificante

Conservación a 10°C		Conservación a 25°C	
PH**	Acidez °D	PH**	Acidez °D
4.58	97	4.50	100
4.40	110	4.33	111
4.33	112	4.27	117
4.23	121		
4.18	125		
<i>S. thermophilus</i> $3.0 \times 10^7$ ufc/ml <i>L. bulgaricus</i> $4.1 \times 10^8$ ufc/ml (28 días)		<i>S. thermophilus</i> $1.5 \times 10^8$ ufc/ml <i>L. bulgaricus</i> $1.0 \times 10^8$ ufc/ml (7 días)	

\* Días tras la fermentación.

\*\* Fermentación detenida en pH 4.6 en todos los casos

Fuente: Abou, C, 2000.

**Cuadro 17. Evolución de las características de una leche fermentada en función de la temperatura de conservación**

Semana	Conservación a 4°C				Conservación a 10°C			
	pH	<i>S. therm.</i> ufc/g	<i>L. bulga.</i> ufc/g	<i>L. acido.</i> ufc/g	pH	<i>S. therm.</i> ufc/g	<i>L. bulga.</i> Ufc/g	<i>L. acido.</i> ufc/g
0	4.5	1.7x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	4.6x10 <sup>6</sup>	4.5	1.7x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	4.6x10 <sup>6</sup>
1	4.3	1.9 x10 <sup>9</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	4.2 x10 <sup>6</sup>	4.2	1.8 x10 <sup>9</sup>	6.0x10 <sup>8</sup>	4.4 x10 <sup>6</sup>
3	4.2	1.8 x10 <sup>9</sup>	4.6 x10 <sup>8</sup>	4.5 x10 <sup>6</sup>	4.0	2.4x10 <sup>8</sup>	3.3 x10 <sup>8</sup>	3.6 x10 <sup>6</sup>
5	4.1	6.2x10 <sup>8</sup>	2.3 x10 <sup>8</sup>	2.4 x10 <sup>6</sup>	3.9	2.6 x10 <sup>6</sup>	1.8x10 <sup>7</sup>	2.0 x10 <sup>6</sup>

Fuente: Abou, C, 2000.

### 5.1.2 ACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y MODIFICACIÓN DEL PRODUCTO A LO LARGO DE LA CADENA DE FRÍO

La acidez inhibe el crecimiento de bacterias. La forma no disociada del ácido es la más inhibitoria, ya que disminuye fuertemente el pH intracelular: así, el ácido clorhídrico, ácido fuerte y por consiguiente completamente disociado, es menos inhibitorio que el ácido láctico, ácido débil y por consiguiente parcialmente disociado. No obstante, algunas cepas de bacterias lácticas pueden realizar una postacidificación en frío: permanecen vivas y utilizan lentamente la lactosa, aún sin registrar crecimiento, produciendo ácido láctico. Una vez acabada esta fase, las bacterias vivas seguirán intensificando algunas de estas modificaciones a través de la reducida actividad que desarrollan. La temperatura y el plazo de almacenamiento del yogur ejercen una influencia sobre la intensidad de la actividad de las bacterias (Abou, 2000).

A partir de la fase proteica de la leche, las bacterias lácticas producen polipéptidos, péptidos y aminoácidos, aumentando así la biodisponibilidad de la fracción nitrogenada del yogur. Los principales aminoácidos libres del yogur son la prolina y la glicina, y la cantidad de aminoácidos esenciales libres se multiplica

por 3,8 si se compara la leche antes de la fermentación y el yogur. La actividad proteásica disminuye paulatinamente a lo largo del período de almacenamiento, aproximadamente un 25% en 15 días. Esta proteólisis, ya moderada durante la fermentación, prosigue a muy baja intensidad, especialmente a una temperatura superior a los 6° C. Así pues, el porcentaje de péptidos aumenta muy poco hasta la FLC, lo que, no obstante, mejora la digestibilidad y el valor nutricional del contenido proteico del yogur (ver cuadro 18).

Sin embargo, si es demasiado intensa, la actividad proteolítica de los fermentos puede hacer que el producto se vuelva amargo y provocar alteraciones tales como la decantación y la aparición del suero, o sinéresis.

**Cuadro 18. Proteólisis del yogur a lo largo de la cadena de frío, expresada en agrupaciones aminadas libres, calculadas en  $\mu$ moles de glicina/ml**

Leche calentada antes de la fermentación	Yogur ( 24 hrs después de la fermentación)	Yogur (21 días después de la fermentación)
1.6	3.6	6.0

Fuente: Abou, C, 2000.

Durante la fermentación, algunas vitaminas B (B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, ácido pantoténico) son consumidas por las bacterias, mientras que otras son sintetizadas, especialmente el ácido fólico; pero esta vitamina, producida por *S. thermophilus*, es utilizada por *L. bulgaricus* ((Abou, 2000).

Durante el almacenamiento en frío, el contenido de vitamina B12 y de ácido fólico sigue decreciendo entre un 20% y un 60% debido a las necesidades metabólicas de las bacterias. La modificación del contenido de vitamina C, de vitamina A y de provitamina A está vinculada con las condiciones de

fermentación y de almacenamiento del yogur, más que con la actividad de los fermentos a baja temperatura.

Durante el período de almacenamiento, la temperatura (4° C) y el pH ácido (4,0-4,5) inhiben la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en el yogur. En cambio, tras la ingestión, las condiciones dentro del intestino le resultan más favorables: pH 7, temperatura a 37° C. El estudio de las muestras del contenido del duodeno y del íleon en personas con déficit de lactasa tras la ingestión de yogur confirma la presencia de una importante cantidad de  $\beta$ galactosidasa, que no es destruida al pasar por el estómago y que, por el contrario, permanece activa a lo largo de su tránsito por el intestino delgado. Los dos factores responsables de esta resistencia son por un lado la función aislante del yogur, que protege la  $\beta$ -galactosidasa de una disminución de pH demasiado importante a nivel del estómago y, por otro lado, la posición intracelular de la enzima, que le permite estar más aislada del mundo exterior gracias a la pared bacteriana (Abou, 2000).

A lo largo de la cadena de frío se producen distintos galactooligosacáridos, cuya concentración aumenta paulatinamente hasta superar el contenido de glucosa (ver cuadro 19). Dichos sacáridos contribuyen a conferirle al yogur su textura característica. Asimismo, gracias a su efecto bifidógeno recientemente confirmado, se puede afirmar que los galacto-oligosacáridos son prebióticos.

**Cuadro 19. Evolución del contenido de sacáridos (%) en un yogur a lo largo de su conservación a 5°C**

Días	Lactosa %	Galactosa %	Glucosa %	Oligosacaridos %	pH
Antes de la fermentación	6.53	0.04	0.00	0.00	6.41
0	5.15	0.70	0.02	0.02	4.90
2	5.02	0.90	0.09	0.16	4.90
4	4.95	0.95	0.11	0.17	4.81
6	4.85	1.05	0.13	0.19	4.77
8	4.71	1.02	0.13	0.20	4.72
10	4.72	1.05	0.14	0.20	4.71

Fuente: Abou, C, 2000.

## 5.2 LA TERMIZACIÓN

La termización, definida como un tratamiento térmico de un producto acidificado a temperatura moderada (60 a 80° C), permite conservar los productos fermentados fuera de la cadena de frío, ya que el tratamiento térmico destruye o desactiva los fermentos lácticos. Para proteger la caseína durante la termización, es necesario utilizar estabilizadores que permiten a los productos conservar su consistencia después del tratamiento (Abou, 2000).

Algunos aditivos o estabilizadores pueden añadirse antes de la fermentación (gelatina, almidón, agar-agar, algunas pectinas), mientras que otros se agregan después de la fermentación (galactomananas, carragenanas, pectinas) para evitar que provoquen la precipitación de las caseínas a lo largo del proceso.

En efecto, los productos lácteos fermentados que van a someterse a una termización contienen entre 0,1% y 0,5% de agentes estabilizadores.

Existen varias tablas de termización (temperatura/ duración) para productos fermentados, que dependen de la tecnología empleada (ver cuadro 20). Las temperaturas aplicadas se sitúan entre 60° C y 90° C, y el tiempo de tratamiento oscila entre algunos minutos y unos pocos segundos (Abou, 2000).

**Cuadro 20. Valores de terminación**

Temperatura	Tiempo de aplicación
80-90°C	20 a 30 segundos
80°C	3 segundos
74°C	5 minutos
70°C	10 minutos
65-85°C	30 minutos a 2 horas ( en función del volumen y del contenedor)
65°C	20 minutos
65°C	10 minutos
60-80°C	10 a 35 minutos
55-65°C	10 a 20 minutos

Fuente: Abou, C, 2000.

En la actualidad, los valores más frecuentemente utilizados en la industria varían entre 72° C y 75° C durante 15 a 30 segundos.

### 5.2.1 EFECTO DE LA TERMIZACIÓN SOBRE LOS FERMENTOS LÁCTICOS

A un pH de 4,6 y hasta 60° C durante 3 minutos, el calentamiento de un yogur conlleva una baja mortalidad de los fermentos lácticos y sólo destruye el 70% de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa.

Después de un tratamiento a 65° C durante 2 minutos, 10<sup>3</sup> UFC/g de bacterias permanecen vivas, pero ya no se detecta ninguna actividad de β-galactosidasa. Después de un tratamiento a 70° C durante 1 minuto, no queda ya ninguna bacteria viva. A un pH de 4,2, estos tratamientos térmicos poseen efectos aún más severos. La actividad de la β-galactosidasa se destruye cuando la enzima, aislada de *L. bulgaricus* y en suspensión en una solución aislante a un pH de 7, se calienta a 60° C durante 15 minutos (Abou, 2000).

El efecto de las tablas tiempo/temperatura sobre la supervivencia de las bacterias lácticas depende en gran medida de la tecnología empleada.

#### 5.2.2 CONSECUENCIAS DE LA TERMIZACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL PRODUCTO, SU EVOLUCIÓN Y SUS CUALIDADES

La formulación de los productos lácteos fermentados sometidos a un proceso de termización difiere de la del yogur, entre otras cosas por la presencia de estabilizadores (Abou, 2000).

El principal efecto de la termización es la destrucción de los fermentos lácticos y de las enzimas del yogur. Se ha constatado la virtual ausencia de fermentos lácticos en el duodeno tanto en el hombre como en el animal tras la ingestión de yogur termizado.

Por añadidura, la termización conlleva una drástica reducción de los componentes aromáticos termosensibles responsables del gusto y del sabor de los yogures, y probablemente de las vitaminas termosensibles. La actividad de la β-galactosidasa se reduce notablemente, llegando a desaparecer en algunos

casos, después de la termización, en función de la tecnología empleada. La  $\beta$ -galactosidasa es 10 veces menos eficaz después de una termización a 63° C durante 30 minutos que haya reducido 100 veces la población de bacterias lácticas (Abou, 2000).

La termización y la congelación son procedimientos industriales suplementarios a los que los productos son sometidos después de la fermentación. Por consiguiente, su utilización implica la fabricación de productos diferentes de los que, después de la fermentación, se conservan en las condiciones normales de la cadena de frío. La termización y la congelación afectan la textura de los productos fermentados, por ese motivo es necesario añadir agentes estabilizadores a los productos que deban someterse a estos tratamientos, así: su composición difiere de la de los productos fermentados sometidos a la cadena de frío (Abou, 2000).

CAPÍTULO VI  
DISPONIBILIDAD Y CONSUMO  
DE PROBIÓTICOS EN MÉXICO

## CAPÍTULO VI

### DISPONIBILIDAD Y CONSUMO DE PROBIÓTICOS EN MÉXICO

#### 6.1 MERCADO DE LÁCTEOS FERMENTADOS PROBIÓTICOS

La elaboración de productos lácteos fermentados es, depuse de las bebidas alcohólicas, la segunda industria de fermentación. La fermentación de la leche para obtener otros productos más duraderos, principalmente yogur y queso, se conoce desde hace más de 6,000 años, aunque no ha sido hasta los últimos cien años cuando se ha postulado el papel favorable de las bacterias añadidas en estos alimentos (Ortega et al, 2002).

El mercado mundial de yogures y otros cultivos lácteos se está iniciando, debido principalmente a los problemas de logística y red de frío.

Por su parte, la industria nacional de yogur ha demostrado una tasa de crecimiento muy importante en los últimos años, 88% entre 1994 y 1999, pues ha podido adaptarse y aprovechar el estilo de vida de la sociedad urbana. Aunque el yogur es también un producto lácteo, tiene vías de comercialización diferentes a la leche pasteurizada.

El consumo de leches y sus derivados se está incrementando principalmente en los países en desarrollo ([www.fira.gob.mx](http://www.fira.gob.mx)).

En México, Nestlé, Danone, Parmalat y Kraft tienen una participación importante en el mercado de lácteos nacional, concentran gran parte de la

producción de leche en polvo, yogur y quesos de alto valor agregado. La penetración de productos a través de marcas está incrementando su importancia. Una marca representa una participación de mercado reconocida por los consumidores tanto por su disponibilidad como por la calidad que representa, como ejemplos representativos se encuentran Nestlé, Danone, Yoplait, Alpura, etc ([www.fira.gob.mx](http://www.fira.gob.mx)).

Aunque la industria de lácteos produce una gran variedad de productos, ésta no se puede considerar como un todo homogéneo, debido principalmente al tipo y origen de sistema de abastecimiento de leche, a la tecnología utilizada y a la integración y dominio de proceso de mercado de sus productos, la industria láctea se ha especializado en cuatro segmentos: tratamiento y envasado de leche (leche pasteurizada y ultra pasteurizada), producción de quesos, producción de yogur y leches industrializadas (leche evaporada, condensada y en polvo).

Después de la elaboración de leches industrializadas, la producción industrial de yogur es la actividad que se encuentra más concentrada (ver cuadro 21). Tres empresas participan con más del 60% de la producción nacional: Danone, Sigma alimentos y Nestlé, otras marcas importantes son: alpura, LaLa ([www.fira.gob.mx](http://www.fira.gob.mx)).

El crecimiento que ha tenido este producto sigue sorprendiendo, de 151,173 toneladas que se estaban produciendo en 1996, pasó a 390,442 toneladas en 2004.

**Cuadro 21. Producción de Yogur en México  
1996-2004**

	Al Natural	Con Frutas	Total
1996	27,799	123,374	151,173
1997	36,154	141,454	177,608
1998	49,073	179,542	228,615
1999	54,455	203,062	257,517
2000	67,938	233,548	301,486
2001	74,780	233,725	308,505
2002	76,638	262,658	339,296
2003	77,432	313,010	390,442
2004	Feb(7,109)	Feb(26,518)	33,627

Fuente: Boletín de leche, 2004

Gran parte del crecimiento que ha observado la venta de yogur en México se ha debido al proceso acelerado de diversificación e innovación del producto, existe una gran variedad de productos que hace pocos años no veíamos: yogur con cereal para mezclar, "Light", con bacterias vivas (probióticos), a esto le sumamos los diferentes tipos de presentación y los grandes esfuerzos de distribución y promoción realizados por la industria. Además, el yogur está posicionado en el mercado nacional como un producto saludable ([www.profeco.gob.mx](http://www.profeco.gob.mx)).

## 6.2 OFERTA DE PROBIÓTICOS EN EL MERCADO

En el mercado existe una variada oferta de productos lácteos fermentados, el más conocido en esta categoría es el yogur, sin embargo, el desarrollo tecnológico ha dado origen a la aparición de las bebidas lácteas

fermentadas, las cuales también se venden bajo las denominaciones "alimento lácteo fermentado" o "producto lácteo fermentado".

La mayor parte de las leches fermentadas tipo yogur o leches fermentadas de textura bebible contienen probióticos específicos investigados o promovidos por la casa que los comercializa. En el cuadro 22 se especifican los principales productos probióticos comercializados en México ([www.profeco.gob.mx](http://www.profeco.gob.mx)).

**Cuadro 22. Oferta de leches fermentadas comercializadas en México**

Denominación Marca/ Contenido neto	Contenido Promedio de Proteína/grasa	Contenido de bacterias benéficas vivas	
		Tipo	Cantidad (UFC/g o mL)*
Alimento lácteo fermentado Activia Danone/150g	3.9%-3.1%	<i>Bifidobacterium bifidus</i> <i>essencis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	72 a 100 millones
Alimento lácteo fermentado para beber Activia Danone/ 250g	2.6%-3.1%	<i>Bifidobacterium bifidus</i> <i>essencis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	29 a 250 millones
Bebida láctea fermentada Actimel Danone/ 100g	2.6%-1.6%	<i>Lactobacillus casei</i> <i>defensis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	690 a 1200 Millones
Bebida láctea fermentada Bio4 LALA/110g	2.9%-1.3%	<i>Lactobacillus casei</i> spp <i>Paracasei</i>	11 a 17 millones
Producto lácteo fermentado Bonacult/ 110mL	1.2%-0%	<i>Lactobacillus casei</i> <i>rhamnosus</i>	39 a 190 miles
Producto lácteo fermentado Chamyto Nestlé/ 76mL (80g)	0.95-0.1%	<i>Lactobacillus jhonsonii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	6 a 12 millones
Alimento lácteo fermentado LC1 Nestlé/ 106mL(110g)	2.6%-1.1%	<i>Lactobacillus jhonsonii</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	500 a 3200 millones
Bebida láctea fermentada Kul-Tai Del valle/ 80mL	1.4%-0%	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	150 mil a 6 millones
Alimento lácteo fermentado Sofúl Yakult/107g	4.0%-2.1%	<i>Lactobacillus casei shirota</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	160 a 380 millones
Producto lácteo fermentado Yakult /80mL	1.1%-0.1%	<i>Lactobacillus casei shirota</i>	230 a 420 millones
Producto lácteo fermentado Yolact/No declara	1.2%-0%	<i>Lactobacillus sp</i>	1-6 millones

\*Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro

Fuente: [www.profeco.gob.mx](http://www.profeco.gob.mx)

Figura 9. Leches Fermentadas con microorganismos probióticos en México



CAPÍTULO VII  
REGULACIÓN LEGISLATIVA EN  
ALIMENTACIÓN FUNIONAL

## CAPÍTULO VII

### REGULACIÓN LEGISLATIVA EN ALIMENTOS FUNCIONALES

#### 7.1 ANTECEDENTES

Los productos alimentarios siempre han sido elaborados con el objetivo de satisfacer las exigencias del consumidor en cuanto a sabor, apariencia, valor y comodidad. La idea de diseñar productos alimentarios con efectos benéficos para la salud es relativamente nueva y responde al cada vez mayor reconocimiento del papel de la dieta en la prevención y tratamiento de enfermedades. Este nuevo enfoque en el desarrollo de nuevos productos alimentarios ha llevado a instituciones y empresas implicadas en la formulación de alimentos con efectos benéficos para la salud a adentrarse en nuevos campos de conocimientos, como los riesgos sanitarios, el análisis riesgo/beneficio, la evaluación de la eficacia y toxicidad y las normativas sanitarias (Mazza, 2000).

El hecho de que no exista una normativa armonizada para su uso hace que esta cuestión esté sometida a un intenso debate desde hace tiempo.

La legislación relativa a los alimentos funcionales está siendo estudiada desde hace algunos años en diversos ámbitos, sin que hasta el momento se haya llegado a un documento definitivo sobre ellos ni en el Comité del Códex sobre el etiquetado de los productos alimenticios, ni en el seno de la Unión Europea (Ortega et al, 2002).

En general, en la discusión en torno a las normativas sobre alimentos funcionales y productos nutracéuticos la cuestión es si se permite a los fabricantes de estos productos informar sobre el efecto de sus productos sobre la salud o, en otras palabras, si pueden o no "declarar" dicho efecto. Para entender la situación de estos productos en diversas partes del mundo es importante comprender lo que significa "una declaración", y también conocer los diversos tipos de información que aparecen o que podrían aparecer en el futuro en las etiquetas o envases.

## INFORMACIÓN EN LOS ENVASES

### Lista de ingredientes

En la mayoría de países debe existir en el envase de un producto alimentario una lista de ingredientes según el orden descendente de su contenido total en el alimento. Es por lo tanto un requisito básico de cualquier producto alimentario informar de los ingredientes alimentarios que lo componen (Mazza, 2000).

### Información nutricional

En algunos países, como en los Estados Unidos, es obligatorio incluir información nutricional en el envase de los alimentos, mientras que en otros se trata de una opción voluntaria. El contenido de la información nutricional (es decir, qué nutrientes deben incluirse y cuáles pueden incluirse) varía de unos países a otros, generalmente dependiendo de la evaluación científica realizada en cada país sobre la importancia para el consumidor de cada nutriente. La información nutricional aparece generalmente en el envase en un cuadro cuyo formato se ha

normalizado en algunos países y es más flexible en otros. En algunos países la información nutricional se da con relación a una ración o medida de consumo "serving" y en otros países por 100g de producto, dependiendo de las unidades que comprendan mejor los consumidores. En algunos países se dan ambas informaciones (Mazza, 2000).

### Declaraciones de contenidos de nutrientes

Las declaraciones de contenido de nutriente "nutrient claims" en el envase indican el contenido de determinado nutriente que el fabricante desea resaltar, generalmente por motivos relacionados con la salud, aunque la declaración en sí no haga referencia a la salud. Los siguientes son ejemplos de declaraciones de contenido de nutrientes: bajo contenido de grasa, sin colesterol, alto contenido de fibra, menor contenido de calorías, 25% menos grasa y Light (Mazza, 2000).

Las declaraciones de contenido de nutriente pueden indicar al consumidor que el producto tiene un determinado contenido de un nutriente, pero no pueden establecer relación alguna con aspectos relacionados con la salud; o en otras palabras, no pueden indicar al consumidor por qué debe importarle que el producto contenga determinada cantidad de ese nutriente. El consumidor debe saber por qué compra un producto que lleva la declaración "con bajo contenido de grasa" o con "alto contenido de fibra".

### Declaraciones de función

Una declaración de función "structure-function claim" es una declaración realizada en un envase de un alimento indicando que determinado nutriente tiene una función determinada en un proceso biológico. Los siguientes son ejemplos de declaraciones de este tipo "el alto contenido de fibra favorece la regularidad" o "el hierro es importante para la función transportadora de oxígeno de los glóbulos rojos sanguíneos" o "el calcio favorece el crecimiento y mantenimiento de los huesos. Ninguna de estas declaraciones hace referencia a ninguna enfermedad, y en general este tipo de declaraciones no pueden referirse directa o indirectamente al tratamiento, remedio o prevención de alguna enfermedad (Mazza, 2000).

### Declaraciones de efectos sobre la salud

Las declaraciones de efectos sobre la salud "health claims" son declaraciones en las que se relaciona un nutriente, conjunto de nutrientes, componente alimentario o producto alimentario con la prevención o tratamiento de una enfermedad. La definición de efecto sobre la salud que se utiliza en la ley sobre etiquetado y educación nutricional de los Estados Unidos es la siguiente: "Una declaración de efecto sobre la salud es cualquier declaración contenida en la etiqueta que de forma explícita (por medio de respaldos, declaraciones escritas, símbolos o viñetas) haga referencia a la relación entre cualquier sustancia con una enfermedad o estado patológico" (Mazza, 2000).

En esta definición no se incluyen las declaraciones relativas a las enfermedades producidas por deficiencias de nutrientes esenciales, las cuales no se consideran declaraciones de efectos sobre la salud. Las aclaraciones de efectos sobre la salud se pueden referir a componentes de los alimentos o a los propios alimentos y, para mayor claridad, es útil distinguir tres tipos (1) genéricas, (2) de alimentos, (3) de producto específico.

## Terminología

Se ha utilizado muchas expresiones para describir los múltiples productos naturales con efectos sobre la salud que están surgiendo actualmente. Algunas de estas expresiones son "productos nutracéuticos" (*nutraceuticals*), "alimentos funcionales" (*functional foods*), "farmalimentos" (*pharmafoods*, "alimentos de diseño" (*designer foods*) (Mazza, 2000).

Debido a la gran diversidad de productos que se incluyen bajo la descripción de productos naturales con efectos benéficos para la salud, existe bastante confusión sobre la terminología que se debe emplear para estos productos, cómo deben estar regulados, si presentan o no riesgos relacionados con la seguridad y si deben permitir o no las declaraciones de efectos sobre la salud. Gobiernos, industrias y expertos de todo el mundo se enfrentan a estos problemas, particularmente en los países desarrollados en los que es mayor el interés de los consumidores por estos asuntos (Mazza, 2000).

## 7.2 ESTADOS UNIDOS

La legislación experimenta actualmente un proceso de mutación, que incluye la supresión de algunas categorías obsoletas, el paso de determinados productos de una categoría a otra, etc. Existen tres textos de ley principales que pueden afectar los alimentos funcionales, a los cuales se suma una nueva propuesta que todavía se está debatiendo:

**Nutrition Labeling and Education Act o NLEA (1990)** Este texto define una serie de declaraciones relativas a la prevención de enfermedades, declaraciones que antes situaban al producto en la categoría de los medicamentos, con todo lo que ello implicaba, por ejemplo, "las fibras reducen el riesgo de cáncer", "el calcio reduce el riesgo de osteoporosis", etc. Ahora, la Food and Drug Administration (FDA) preestablece los términos que deben emplearse en estas declaraciones y determina en qué condiciones se pueden utilizar. Por otra parte, el texto sigue autorizando el uso de declaraciones de tipo estructura/función (Roberfroid, 1999)

### **Dietary Supplement Health and Education Act oDSHEA (1994)**

Este texto normaliza una categoría muy extensa de productos y permite formular declaraciones que se sitúan entre sustancia alimentaria y función higiénica, siempre que se informe bien a los consumidores sobre las diferencias en el uso de dichos productos y los alimentos tradicionales.

## Food and Drug Administration Modernization Act o FDAMA (1997)

Como su nombre lo indica, este texto está destinado a actualizar la ley en un sentido más amplio. Siempre que se utilice una "declaración autorizada" de los Institutos de Sanidad o de la Academia de Ciencias, está permitido formular declaraciones sin la aprobación previa de la FDA, aunque se le debe notificar al respecto 120 días antes de la introducción del producto en el mercado, mediante la presentación de un informe que incluya los términos exactos empleados en la declaración y todas las publicaciones científicas que la avalen; la FDA puede intervenir a posteriori para solicitar la supresión de las declaraciones en cuestión, cosa que ya ha hecho en 1998 (Roberfroid, 1999).

En abril de 1998 la FDA hizo una propuesta para codificar la categoría de los dietary supplements, que permite distinguir las declaraciones de tipo estructura/función (autorizadas bajo algunas condiciones, como se acaba de ver) y las declaraciones relativas a la prevención de enfermedades (prohibidas), lo cual no siempre resulta fácil.

En esta misma ocasión, se propuso también una nueva definición de enfermedad que ha suscitado un gran revuelo; de adoptarse, algunos productos empleados en el acompañamiento de la menopausia o en la sintomatología del envejecimiento, por ejemplo, pasarían a considerarse medicamentos. El debate todavía está abierto. Cada vez se requerirá más la asistencia de profesionales del derecho en el lanzamiento de nuevos productos (Roberfroid, 1999).

### 7.3 JAPÓN

Probablemente sea el país en el que más se ha profundizado la reflexión sobre estos temas, ya que ha sido el primero en traducir en palabras contemporáneas la muy tradicional relación reconocida en Asia entre higiene de vida (que incluye la alimentación) y salud.

En Japón la legislación se refiere fundamentalmente a los alimentos funcionales, es decir, a los productos que se venden como alimentos. Desde principios de los años 80's se han venido desarrollando este campo en Japón para intentar solucionar los problemas médicos de la tercera edad, un sector cada vez más importante de la población. Los ministerios de Agricultura y de Salud y bienestar han tratado de desarrollar componentes alimentarios con posibles efectos benéficos para la salud, lo cual concuerda con el concepto oriental tradicional de que las sustancias alimentarias intervienen en la prevención y tratamiento de las enfermedades. En 1991, el Ministerio de salud y bienestar estableció un sistema de concesión de licencias para alimentos para uso específico para la salud, (*Foods for specified Health Use, FOSHU*) (Mazza, 2000).

Cuando se solicita una licencia FOSHU al ministerio encargado de la evaluación de un alimento funcional se debe aportar la siguiente información: (1) ingredientes y composición del alimento, (2) efectos benéficos para la salud del alimento, y (3) datos sobre su seguridad. Existen actualmente en Japón 11 categorías de ingredientes funcionales incluidos en el sistema FOSHU:

- Fibra alimentaria,
- Oligosacáridos,
- Alcoholes derivados de azúcares,
- Ácidos grasos poliinsaturados,
- Péptidos y proteínas,
- Alcoholes y fenoles,
- Glucósidos, isoprenoides y vitaminas,
- Lecitina,
- Bacterias ácido lácticas,
- Minerales,
- Otros.

Se han identificado los principales efectos benéficos sobre la salud que producen cada uno de estos ingredientes. Por ejemplo, los efectos benéficos que corresponden al grupo de oligosacáridos son probablemente los siguientes: (a) bajo contenido calórico, (b) prevención de problemas dentales, (c) control intestinal y, (d) bifidobacterias (Mazza, 2000).

Para ser aprobado, el alimento debe cumplir con los siguientes criterios:

- Debe contribuir a mejorar los hábitos alimentarios y mantener y mejorar la salud.
- Los efectos benéficos para la salud del alimento o componentes deben estar basados en principios médicos y nutricionales claros.
- Se deberá definir la forma adecuada en que se debe consumir el alimento o sus constituyentes.

- El alimento y sus constituyentes deben ser considerados seguros.
- Deben estar bien definidos los métodos para la determinación de las propiedades fisicoquímicas de los constituyentes y para el análisis cualitativo y cuantitativo de los mismos.
- La composición nutricional del producto no debe ser significativamente inferior a la de los alimentos similares.
- El alimento debe consumirse de la forma habitual, y no con carácter ocasional sino diario.
- El producto debe tener la forma de un alimento normal, y no en forma de píldora, cápsula u otra forma de dosificación.

Una vez probado, se pueden indicar en la etiqueta del producto sus efectos beneficiosos para la salud, pero no de forma engañosa ni exagerada. Los fabricantes no pueden fomentar el consumo excesivo del alimento, ni incitar de forma alguna al consumidor a que no reciba tratamiento médico, ni difamar a los productos de la competencia (Roberfroid, 1999).

#### 7.4 UNIÓN EUROPEA

No hay una legislación homogénea que codifique en detalle las declaraciones de propiedades nutricionales o higiénicas en la Unión Europea: en efecto, las normas varían de país a país, lo cual no facilita la circulación de productos.

En la Unión Europea (UE) todo el sector de los alimentos funcionales y los productos nutracéuticos está bastante fragmentado, ya que actualmente cada país miembro sigue una estrategia diferente.

La mayor parte de los esfuerzos por establecer una política común se han realizado en el sector de los alimentos funcionales (es decir, los productos consumidos como alimentos). Las directivas sobre alimentos con efectos sobre la salud parecen dirigirse en dos direcciones: por un lado los alimentos para usos nutricionales particulares (*foods for particular nutritional uses, PARNUTS*) y por otro los alimentos funcionales, contemplados en una iniciativa llamada "Ciencia de los alimentos funcionales en Europa" coordinada por la oficina en Europa del ILSI (Roberfroid, 1999).

PARNUTS es una directiva que engloba a nueve categorías de alimentos para usos nutricionales especiales:

- Fórmulas infantiles,
- Leche de continuación y otros alimentos de continuación,
- Alimentos infantiles,
- Alimentos con bajo contenido energético y con contenido energético reducido diseñados para controlar el peso,
- Alimentos dietéticos para usos médicos especiales,
- Alimentos con bajo contenido de sodio, incluyendo las sales con bajo contenido de sodio y las sales sin sodio,
- Alimentos sin gluten,
- Alimentos diseñados para el esfuerzo muscular intenso, especialmente para deportistas,
- Alimentos para diabéticos.

La iniciativa "Ciencia de los alimentos funcionales en Europa" surgió para que Europa declare de forma clara su posición respecto a los alimentos funcionales con objeto de mejorar su competitividad industrial en el contexto de un mercado crecientemente globalizado". El principal objetivo del proyecto era establecer un foro de discusión multidisciplinar para alcanzar el consenso o definir conceptos científicos relativos a los alimentos funcionales y establecer los requisitos de los alimentos funcionales (Roberfroid, 1999).

Se han identificado seis campos de investigación científica:

- Funciones gastrointestinales,
- Funciones de comportamiento y psicológicas,
- Concepto y desarrollo,
- Modulación del metabolismo de lípidos,
- Impacto de la tecnología de los alimentos,
- Control del estado redox.

Aunque esta iniciativa parece concentrarse en los aspectos científicos de los alimentos funcionales, se ha indicado que los principales productos de interés son todos aquellos alimentos que declaren que tienen efectos sobre la salud y los científicos, la industria y la administración deben trabajar conjuntamente para la correcta evaluación de los principios y criterios que deben regir la demostración de las declaraciones de efectos sobre la salud. Se pretende de esta forma que el documento de consenso sirva de guía para la evaluación de la base científica de las declaraciones de efectos sobre la

salud. Sin embargo, parece ser que el objetivo de esta iniciativa no es dirigir las transformaciones de la normativa de la Unión Europea, ya que se indica que es cada país miembro quien debe decidir qué normativa debe regir los alimentos funcionales y productos nutracéuticos o concentrados en los países respectivos (Roberfroid, 1999).

La mayor parte del coste del proceso de obtención de una declaración de efectos sobre la salud se destina a las siguientes actividades: análisis químico, estudios con sujetos humanos y presentación de la información a la administración. Muchos de los métodos son laboriosos y por lo tanto costosos, pero una vez desarrollada y validada la metodología, es difícil que se produzca ambigüedad en los resultados.

Como muchos alimentos funcionales son desarrollados por empresas y organizaciones pequeñas y medianas, se debe facilitar a nivel nacional la realización de estudios controlados con sujetos humanos, y se deben poner los medios financieros necesarios para ello.

Quienes desarrollen nuevos productos benéficos para la salud deben asumir que los ensayos con sujetos humanos forman parte del desarrollo del producto y que sin llevar a cabo dichos ensayos será imposible poder declarar los efectos benéficos del producto. Iniciar la fabricación de un nuevo producto sin haber tenido en cuenta la necesidad de demostrar científicamente su efecto como una parte integral del proceso general de desarrollo del producto es una aventura abocada al fracaso.

En la mayoría de los países, la responsabilidad de demostrar que un alimento o producto tiene un determinado efecto fisiológico o bioquímico o sobre una patología es del productor, en los EE UU es responsabilidad de las instituciones

federales, ya sea la FDA o la comisión federal de comercio, asegurar que las empresas cumplen con dicha ley (es decir, que los productos son seguros, que no contienen declaraciones engañosas)

### **Codex Alimentarius**

El texto más reciente relativo a la declaración de propiedades nutricionales es el adoptado por la Comisión del Codeex Alimentarius en su 22º sesión de 1997 (CAC/GL 23-1997). En él se distinguen las declaraciones de propiedades nutricionales de las declaraciones de propiedades higiénicas que aún hoy son objeto de debate (26).

Las **declaraciones nutricionales** pueden agruparse en tres tipos:

- | declaraciones vinculadas al contenido nutricional, por ejemplo, "fuente de calcio";
- | declaraciones comparativas relativas a la aportación energética o al contenido de un nutriente, por ejemplo, "bajo contenido de...";
- | declaraciones relacionadas con la función de un nutriente, que describen su función fisiológica en el crecimiento, el desarrollo y las funciones normales del organismo, por ejemplo, "el calcio contribuye al desarrollo de dientes y huesos sólidos"(26).

Las declaraciones nunca deben aludir, ni siquiera de forma implícita, al hecho de que el nutrimento podría permitir curar, tratar o prevenir una enfermedad.

El **etiquetado nutricional** está regido por otro texto del Codeex (CAC/GL 24-1997).

Según el último proyecto Alinorm 99/22, las **declaraciones de propiedades higiénicas** también se dividen en tres categorías:

- declaraciones de tipo fisiológico: se atribuyen efectos directos sobre el organismo a un alimento, un nutriente o una sustancia, por ejemplo, "el aceite de pescado reduce los triglicéridos del suero y hace que la coagulación sea más lenta";
- prevención de una enfermedad, atribuida a un nutriente o a una sustancia contenida en el alimento, por ejemplo, "este alimento contiene fibras solubles que reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular";
- prevención de una enfermedad o efectos sobre la salud vinculados al tipo de alimentación, por ejemplo, "una alimentación pobre en grasas contribuye a disminuir el riesgo de cáncer. Este producto es un alimento pobre en grasas".

La diferencia entre estos tipos de declaraciones no siempre es fácil de establecer y está sujeta a interpretaciones contradictorias, que deberán no obstante empezar a coincidir gradualmente. Por otra parte, debemos considerar el hecho de que, para el consumidor, toda declaración de tipo funcional está en última instancia vinculada a la salud o a la prevención de enfermedades, y quizás sea necesario concentrarse más en este punto.

En lo que respecta a la reglamentación sobre probióticos, la FAO reporta lo siguiente:

## 7.5 ASPECTOS LEGISLATIVOS RELACIONADOS A LOS PRODUCTOS PROBIÓTICOS.

### Cuestiones de reglamentación

Las reglamentaciones de los gobiernos difieren entre países, pero en la actualidad no se ha establecido a nivel internacional la situación de los probióticos como componente de los alimentos. En su mayor parte, los probióticos se presentan en forma de alimentos y suplementos dietéticos, porque en su mayoría se administran oralmente como alimentos. Estos se diferencian de los medicamentos en diversos aspectos, especialmente en lo que concierne a las declaraciones de propiedades. En el caso de los medicamentos están autorizadas las declaraciones de propiedades relativas a su eficacia en el tratamiento, la mitigación o la cura de una enfermedad, mientras en el caso de los alimentos, los aditivos alimentarios y los suplementos dietéticos sólo pueden hacerse declaraciones de propiedades saludables de carácter general.

### Etiquetado apropiado

Con el fin de aclarar la identidad del probiótico presente en el alimento, se declarara en la etiqueta la especie microbiana. Si se ha realizado un proceso de selección en lo que respecta a la cepa, debería incluirse también la identidad de ésta, dado que el efecto probiótico parece ser específico de cada cepa.

Es necesario enumerar con precisión las bacterias probióticas presentes en los productos alimenticios con el fin de incluirlas en la etiqueta. En ésta debería declararse la concentración viable de cada probiótico presente al final de su período de conservación.

### **Procedimientos de fabricación y manipulación**

Para garantizar que cualquier cultivo conserve sus propiedades beneficiosas, se debería mantener el material cultivado en condiciones apropiadas y comprobar periódicamente la identidad y las propiedades probióticas de la cepa. Por otra parte, se debería mantener la viabilidad y la actividad probiótica durante todo el proceso de elaboración, manipulación y almacenamiento del producto alimenticio que contiene el probiótico, verificándolas cuando concluya el período de conservación.

En la actualidad no se ha establecido a nivel internacional la situación reglamentaria de los probióticos como componente de los alimentos. Sólo en algunos países hay procedimientos de reglamentación en vigor o suficientemente desarrollados para poder describir los beneficios específicos para la salud de los productos probióticos.

## CONCLUSIONES

1. Diversos estudios han demostrado los efectos benéficos de las leches fermentadas con bacterias probióticas, sin embargo existe la necesidad de estudios más profundos con particular hincapié en las relaciones dosis-respuesta y el tiempo de exposición a los probióticos, así como los mecanismos de acción.
2. Es necesario perfeccionar los ensayos *in vitro* e *in vivo* a fin de predecir mejor la capacidad de los microorganismos probióticos para funcionar en los seres humanos.
3. Una declaración de propiedades benéficas debe basarse en estudios clínicos que requiere de un enfoque multidisciplinario que relacione especialistas en nutrición, medicina y la participación de la industria e instituciones.
4. Debido al gran número de cepas probióticas, y al hecho de que muchas se parezcan significativamente a otras, es necesario la apropiada identificación de las cepas para la correcta rotulación en la etiqueta y para ayudar en la predicción de su funcionalidad.
5. En el desarrollo de nuevos productos con probióticos se debe considerar las características fisicoquímicas del alimento al que se piensa introducir, así como las condiciones de procesamiento a las que

éste es sometido, para no contrarrestar la actividad probiótica de las bacterias utilizadas. Las cepas tienen que ser seleccionadas no sólo por su actividad prebiótica sino también por su adaptabilidad a las condiciones de manufactura y distribución.

6. Es necesario que el contenido inicial de bacterias lácticas sea lo suficientemente elevado para que en el momento de la caducidad de los productos se encuentren en una cantidad suficiente ( $10^6$ - $10^7$  microorganismos por mL) para que puedan ejercer su acción benéfica sobre la salud.
7. Aunque el medio más habitual de consumo de probióticos son los productos lácteos, el avance de la tecnología ha permitido su incorporación a embutidos, quesos, leches infantiles, zumos de frutas, etc.
8. Es necesario establecer una legislación internacional que permita regular a los alimentos funcionales en especial a los probióticos, que permita declaraciones con respecto a los beneficios en la salud. En México no existe una norma en la que se haga mención el uso de estos microorganismos y la demanda de este tipo de alimentos continúa incrementándose.
9. En poco tiempo el consumidor podrá ser capaz de elegir entre una gran variedad de leches fermentadas, no solamente por el tipo de

microorganismo y sus diferentes cualidades organolépticas, sino también por sus efectos específicos sobre la salud.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abou, C. 2000. *Los tratamientos térmicos*. Danone World Newsletter, 20:2-17.
2. Adleberth, I. 1998. *Mechanisms of protection of the digestive tract*. Danone Vitalpole Research. Ed. John Libbery Eurotext.
3. Agarwal K.N. 2001. *Fermented Foods and Healthy Digestive Functions*. Danone Vitalpole Research. Ed. John Libbery Eurotext.
4. Alvidrez-Morales Alicia. 2002. *Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos Funcionales*. Salud Pública y Nutrición, 2002 3(3).
5. Bass, I. 2000. *Funcional Dairy Products*. Danone Vitalpole Research. Ed. John Libbery Eurotext
6. Beaufrère, B. 2003. *Estudios clínicos de intervención en nutrición; Definición de un marco coherente y adecuado*. Danone Nutritopics, 27:2-17.
7. Boletín de leche 2004 SAGARPA Enero-Febrero 10(1) 17

8. Bourgeois, C ; Larpent J. 1995. *Microbiología Alimentaria. Volumen II Fermentaciones alimentarias*. Zaragoza, España. Ed.Acribia. Pág. 3-15, 211-225
9. Bourlioux, P. 1998. *Composition et roles de la flore intestinale*. La lettre de L'Institut Danone. 41:5-9.
10. De las Cagigas Reig Ada Lydia. 2001. *Los probióticos y su efecto inmunomodulador*. Alimentaría. 324:29-34.
11. De las Cagigas Reig Ada Lydia. 2002. *Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa*. Revista Cubana Alimentación Nutr;16(1).
12. Early Ralph. 1998 *Tecnología de los Productos Lácteos*. Ed. Acribia. Pag.51-81, 127-160.
13. Escalante, A. 2000. *Técnicas moleculares en la investigación de probióticos*. Memorias 2do. Simposio Mexicano de Probióticos. Guadalajara, Jalisco
14. Dennis Lo, Y. M. 1998. *Clinical applications of PCR*. Ed. Humana Press Inc. Pág. 3-9.
15. Fuller, R. 1992. *Probiotics*. Ed. Chapman and Hall. Page. 354-376.

16. García-Garibay, M. 2000. *Leches Fermentadas en México*. Cuadernos de la Nutrición. 23 (4):469-474.
17. García-Garibay Mariano.2003. *La leche como alimento funcional*. Memorias 3<sup>er</sup> Simposio Mexicano de Probióticos.
18. Garduño Torres. 2001 *El Desarrollo de Alimentos Funcionales: ¿Tarea de Romanos?*. Industria Alimentaria. .23 (4).
19. Klaenhammer, Todd R.1999. *Selection and design of probiotics*. International Journal of food Microbiology 50; 45-57
20. Lomelí Martínez. 2001. *I Seminario sobre aditivos e Ingredientes para alimentos Funcionales*. Industria Alimentaria .23 (2). Marzo-Abril
21. Macrae, R; Robinson, R. 1993. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Vol. V. Pag. 3031-3038, Vol.III. pag.1795-1813.
22. Mazza. 1998. *Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado*. zaragoza, España. Editorial Acribia.
23. Milke García Pilar 2000. *Flora intestinal y Salud* Memorias 2<sup>o</sup> Simposio Mexicano de Probióticos. Guadalajara, Jalisco

24. Nagendra P. Shah. 2001. *Funcional Foods from Probiotics and Prebiotics*. Food Technology. 55 (11):46-52.
25. Ortega y col. 2002. *Alimentos Funcionales. Probióticos*. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
26. Quintero, López. M; García, M. 1999. Biotecnología alimentaria. Ed. Limusa. Pág. 153-179.
27. Rivero Montserrat. 2000. *Resumen de la Videoconferencia sobre Alimentos funcionales*. Noviembre. Laboratorios Odesa
28. Rizzo Romolo. 2000. *Influencia de la lactancia materna en la flora intestinal*. 2do simposio Mexicano de de Probioticos.
29. Reuter, G; Günter, K. 2002. *Identification of probiotic cultures in food samples*. Food Research International. 35: 117-124.
30. Roberfroid, M. 1999. *Los alimentos funcionales*. Danone World Newsletter, 18:2-18.
31. Robinson, K; Abatt, C. 2000. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol.1. pag.210-217; Vol.II. Pág. 774-785,1134-1163.
32. Saloff-Coste, C . 1994. *Lactic acid Bacteria*. Danone World Newsletter,5:2-8.

33. Saloff-Coste, C. 1994. *Health Benefits of Lactic Acid Bacteria*. Danone World Newsletter, 6:2-6
34. Saloff-Coste, C. 1995. *Lactobacillus casei*. Danone World Newsletter, 7:2-8.
35. Saloff-Coste, C. 1996. *Kefir*. Danone World Newsletter, 11:2-6.
36. Saloff-Coste, C. 1997. *Lactobacillus acidophilus*. Danone World Newsletter, 13:2-7
37. Saloff-Coste, C. 1997. *La microflora gastrointestinal y las leches fermentadas*. Danone World Newsletter, 14:2-18.
38. Saloff-Coste C. 1997. *Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud: Una Revisión*. Danone World Newsletter, 15:2-8.
39. Saloff-Coste, C. 1998. *Bifidobacterias*. Danone World Newsletter, 16:2-8.
40. Symons, H. 1994. *Bifidobacteria*. Danone World Newsletter. 3:2-9
41. Schrezenmeir; de Vrese, M. 2001. *Probioticos, prebióticos y simbioticos aproximación a una definición*. AmJ Clin Nutr ; 73 (Suppl) 361S-4S

42. Spreer Edgar. 1991. *Lactología Industrial*. Editorial Acribia. 2<sup>da</sup> Edición.
43. Stanley E. Gilliland. 2000. *Fermented Milks and Probiotics*. 2do Simposio Mexicano de probióticos, Junio.
44. Staton Catherine, Gardier G. 2001. *Market potencial for probiotic*. Am J Clin Nutr; 73
45. Torres Vitela. 2002. *Flora intestinal, probióticos y salud*. Ed. Formas Finas. Yakult. 2<sup>da</sup> Edición.
46. Vasconcellos. *Alimentos funcionales. Conceptos y Beneficios Para la Salud*. <http://WWW.worldfoodscience.org>
47. Varman. H.A, Sutherland P.J. 1994. *Leche y productos lácteos. Tecnología química y microbiología*. Ed. Acribia.
48. Vega y León Salvador. 2002. *Alimentos Funcionales, diferencias con otros alimentos similares*. Industria Alimentaria. 24(1) Enero-Febrero
49. <http://WWW.usprobiotics.org>
50. <http://WWW.mesander.com>

51. <http://WWW.fira.gob.mx/boletines/boletin009.pdf>

52. <http://WWW.fao.org>

53. <http://WWW.profeco.gob.mx/revista/pdf/estudios.htm>