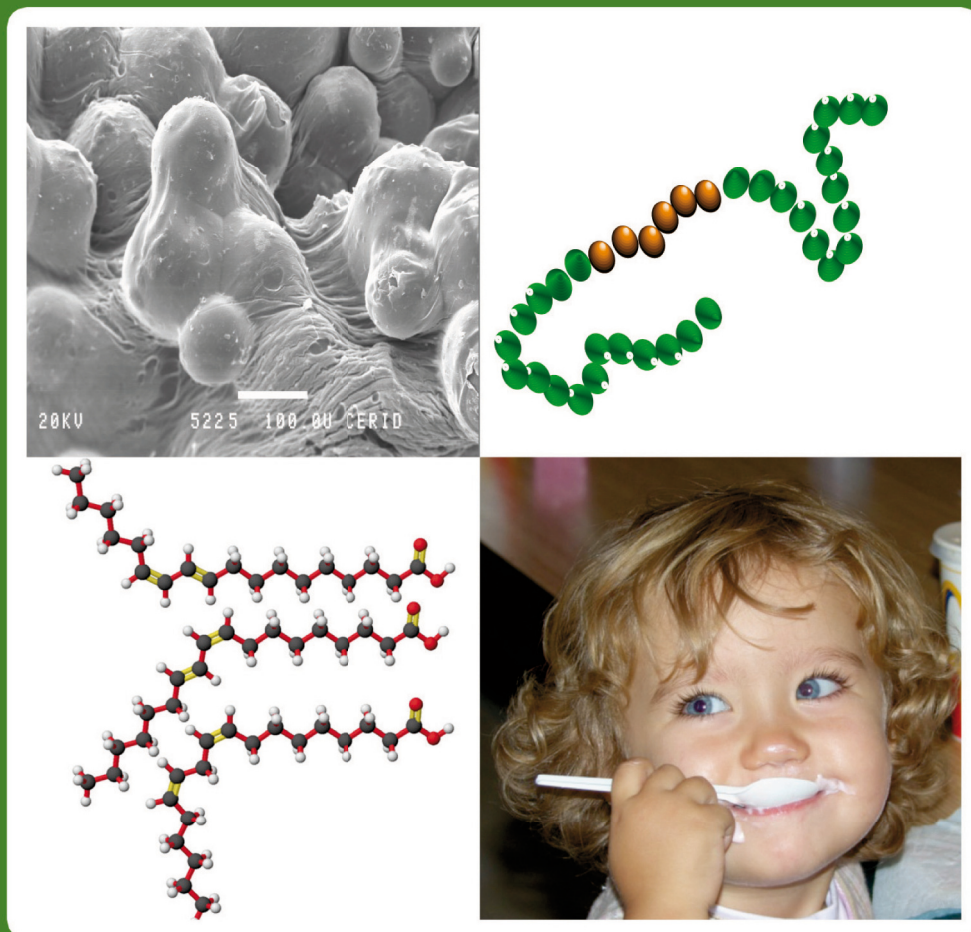


Funcionalidad de Componentes Lácteos



Eds: Javier Fontecha, Isidra Recio, Ana M.R. Pilosof



Recuperación y revalorización del lactosuero para la producción de nuevos productos con propiedades funcionales.

A.R. Madureira, A.I. Pintado, A. M. Gomes, F. X. Malcata y M. E. Pintado*

CBQF- Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.

Rua Dr. António Bernardino de Almeida. 4200-072 Porto, Portugal

Tel.: +351 22 5580001 Fax: +351 22 5090351

**E-mail: mmpintado@esb.ucp.pt*

Resumen. En los últimos años han surgido gran cantidad de alimentos funcionales a los que se les atribuyen diversas propiedades beneficiosas. Entre estos alimentos se encuentran aquellos que contienen proteínas del lactosuero así como aquellos que incorporan bacterias probióticas en su composición. En la actualidad existen matrices de proteínas de suero que contienen bacterias probióticas que se mantienen viables durante 28 días a temperaturas de refrigeración. Además, también se han realizado diferentes estudios relacionados con la actividad metabólica, las propiedades antimicrobianas y la resistencia a las enzimas del tracto gastrointestinal. Por último, se ha evaluado el uso de cepas de bacterias del ácido láctico con propiedades probióticas en la producción de exopolisacáridos en lactosuero.

1. Productos lácteos probióticos

El consumo de productos lácteos que contienen cepas probióticas viables ha aumentado considerablemente en los últimos años, en especial debido a las propiedades saludables que se asocian al consumo de este tipo de productos. Esta tendencia ha provocado su diversificación en el mercado mundial. La demanda de estos productos ha sido impulsada principalmente por sus diferentes beneficios, atribuidos en especial a varias bacterias que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, (Lee y Salminen, 1995; Reid, 1999), siempre y cuando puedan

colonizar la parte inferior del intestino. Sin embargo, una condición necesaria (aunque no suficiente) para que se produzca esta colonización es que los mencionados productos contengan al menos 10^7 ufc/ml de bacterias probióticas en el momento de su consumo (FAO, 2001).

Productos lácteos como el yogur (Reuter, 1990; Laroia y Martin, 1991), los helados (Hekmat y McMahon, 1992) y el queso (Gomes y col., 1995, 1998, Stanton y col., 1998) son claros exponentes del éxito de alimentos que contienen microorganismos probióticos. Tipos de queso que hayan sido objeto de investigación en este campo incluyen (en orden cronológico): queso blanco salmuera (Furtado y col., 1993), queso Cheddar (Dinakar y Mistry, 1994; Shaw y White, 1994; Daigle y col., 1997; Gardiner y col., 1998), queso Gouda (Gomes y col., 1995), queso Cottage (Blanchette y col., 1996; Riordan y Fitzgerald, 1998), queso Crescenza (Gobbetti y col., 1998), queso semi-duro de cabra (Gomes y Maccata, 1998) y queso fresco Argentino (Vinderola y col., 2000). Sin embargo, existe una clase de queso sobre la cual se han realizado hasta la fecha muy pocos estudios relacionados con la incorporación de bacterias prebióticas; son los quesos de suero de leche.

1.1. Potencialidad del lactosuero como vehículo para bacterias probióticas.

El suero de leche es la parte acuosa de la leche obtenida tras procesos de coagulación con ácido, calor o cuajo en la producción de queso. Gran parte del volumen mundial de suero de leche se utiliza actualmente para la producción de una gran variedad de productos de elevado valor añadido (descrito en capítulos anteriores). Sin embargo, en Portugal, España y otros países latino americanos el suero de leche sigue siendo eliminado especialmente por las pequeñas industrias lácteas que en conjunto suman importantes volúmenes globales (Pintado y col., 2001). La eliminación de este producto trae consigo no sólo una pérdida importante de

nutrientes, sino también plantea graves problemas para el medio ambiente, debido a su alta demanda biológica y química de oxígeno.

La recuperación de proteínas solubles de suero de leche puede ser utilizada en la producción de queso, lo cual podría ser muy interesante tanto desde el punto de vista nutricional como biológico. El requesón es un queso de suero (similar al queso Ricotta), que se consume normalmente en natural o combinado con sal o azúcar. Se fabrica a través del procesado térmico de suero de leche, lo que conduce a la desnaturalización de las proteínas solubles. La elaboración de requesón supondría un medio adecuado para recuperar las proteínas de suero de leche y una alternativa económica para las pequeñas industrias lecheras (para los que la aplicación de la cromatografía de membrana o de las tecnologías basadas en separación es difícil y costosa). Existen diversos estudios relativos a la optimización de la fabricación y el envasado de este tipo de queso de suero (Pintado y col., 1996; Pintado y Malcata, 2000a, b, c), pero en todos los casos la monitorización de la flora microbiana se limita a microorganismos adventicios y microorganismos contaminantes presentes en el ambiente. Uno de los incentivos para la utilización de suero de leche incluye la incorporación de especies de bacterias probióticas en la elaboración del requesón, lo que podría suponer una ventaja competitiva en términos de marketing. Diferentes estudios para mejorar la viabilidad de las bifidobacterias han demostrado la existencia de una prometedora relación entre cepas probióticas y las proteínas de suero de leche. Marshall y col. (1982) fortificaron leche con proteínas de suero de leche y treonina a fin de proporcionar a las bifidobacterias un medio nutritivo con un bajo potencial redox. Por otra parte, Dave y Shah (1998) estudiaron los efectos de suero de leche en polvo, concentrado de proteínas de suero (CPS) e hidrolizados de caseína ácida (HCA) sobre la viabilidad de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp., *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias en el yogur.

Tabla 1: Composición proteica del suero de leche (adaptado de Madureira et al., 2007).

Proteína	Concentración (g/L) ^{1,4}	Peso molecular (kDa) ^{2,3}	Número de residuos de aminoácidos ²
β-lactoglobulina	1.3	18,277	162
α-lactoalbúmina	1.2	14,175	123
Albumina sérica	0.4	66,267	582
Imunoglobulinas (A, M & G)	0.7	c. de 150,000	---
Lactoferrina	0.1	80,000	700
Lactoperoxidasa	0.03	70,000	612
Glicomacropéptido	1.2	6,700	64

¹ de Wit (1998), ² Eigel y col. (1984), ³ Brew y col. (1970), ⁴ Korhonen (1995)

Tabla 2. Funciones biológicas de las proteínas de suero lácteo (adaptado de Madureira et al., (2007).

Proteína	Función biológica
Proteínas de suero totales	Prevención de cáncer (cáncer de mama y intestinal; cáncer inducido por químicos); Incremento de la concentración de glutatión (Aumento de la vulnerabilidad de las células tumorales; tratamiento de pacientes con HIV) Actividad antimicrobiana Incremento de la sensación de saciedad (Aumento de aminoácidos en plasma, colecistoquinina y péptidos tipo-glucagon)
β-Lactoglobulina	Transportador (Retinol, Palmitato, Ácidos grasos, Vitamina D y colesterol) Aumento de la actividad de la esterasa pre-gástrica Transferencia de la inmunidad pasiva Regulación del metabolismo del fósforo en las glándulas mamarias
α-Lactalbúmina	Prevención de cáncer Tratamiento de la enfermedad crónica inducida por stress
Albumina sérica bovina	Unión a los ácidos grasos Funciones anti-mutagénicas Prevención de cáncer
Immunoglobulinas	Inmunomodulación (protección de enfermedades por inmunidad pasiva) Actividad antimicrobiana (bacterias y hongos) Actividad opioide

La adición de CPS y HCA mejoró la viabilidad de las bifidobacterias hasta niveles variables debido a la fuente de nitrógeno adicional proporcionada en forma de péptidos y aminoácidos libres. Por último, no hay que olvidar que las proteínas de suero de leche contienen residuos de aminoácidos que son ricos en azufre, el cual, al ser liberado por el calor o tratamiento enzimático contribuye a reducir el potencial redox. Los resultados antes mencionados sugieren que el requesón puede ser un buen sistema de incorporación de bacterias prebióticas, en particular los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

1.2. Propiedades biológicas de las proteínas de suero de leche.

Hipócrates ya proclamó las propiedades saludables del suero en la Antigua Grecia. Durante la Edad Media, el suero de leche se consideró no sólo como un medicamento, sino incluso como un afrodisíaco y un bálsamo para la piel: se trataba de un componente común de pociones y bálsamos para calmar las quemaduras, aumentar la vitalidad y curar diversas enfermedades (Kosikowski, 1982). Las últimas décadas han sido testigos de un creciente interés en los productos de proteína de suero de leche debido a su papel en la nutrición y a su cada vez mayor importancia en la salud humana.

Las proteínas del suero son moléculas globulares con un contenido substancial de α -hélice, en la que los aminoácidos ácido/base e hidrofóbicos/hidrofílicos se distribuyen de una forma bastante equilibrada a lo largo de sus cadenas polipeptídicas (Evans, 1982). La composición proteica del suero de leche, incluyendo el peso molecular y el número de residuos de aminoácidos de cada proteína, se detalla en la Tabla 1. Las proteínas de suero de leche incluyen β -lactoglobulin (β -LG), α -lactoalbúmina (α -LA), inmunoglobulinas (Ig), albúmina sérica bovina (BSA), lactoferrina bovina (BLF) y lactoperoxidasa (LP), así como otros componentes menores. Sus

concentraciones reales dependen del tipo de suero de leche (ácido o dulce), la fuente de leche (bovina, ovina o caprina), la época del año, el tipo de alimento recibido por el animal, la etapa de lactancia y la calidad del tratamiento (Pintado y col., 2001). Sus principales actividades biológicas se resumen en la Tabla 2.

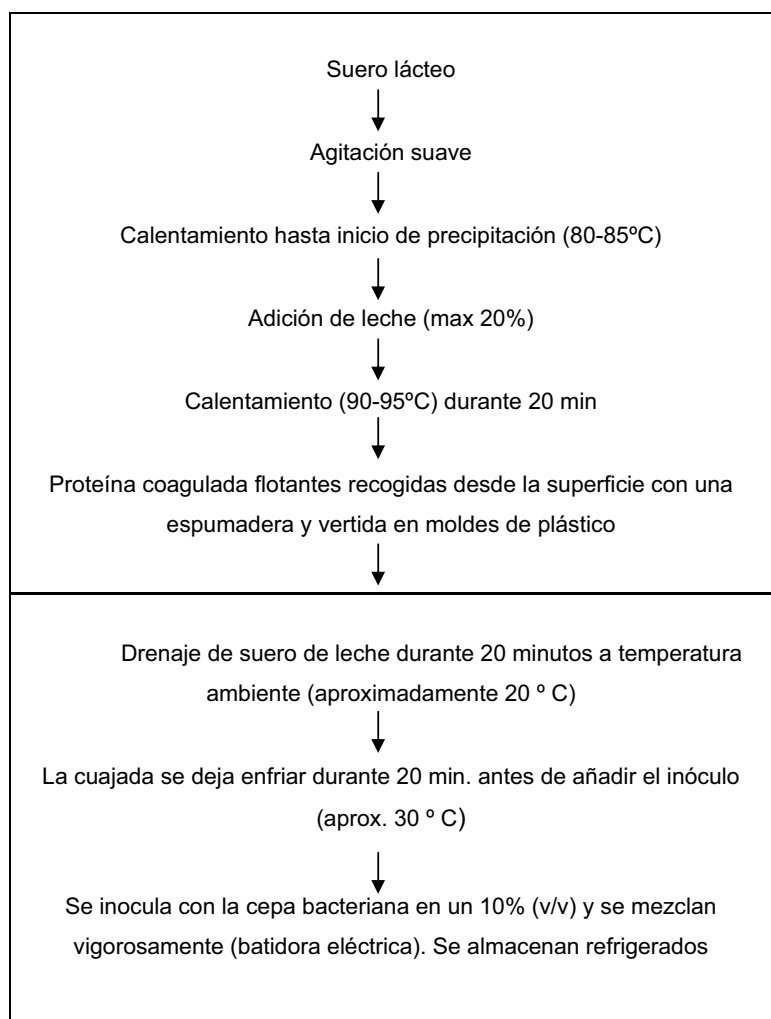


Figura 1. Diagrama esquemático de la producción de matrices de queso de suero con incorporación de cepas probióticas.

2. Incorporación de cepas probióticas a las matrices de queso de suero

2.1. Producción de requesón probiótico

La fabricación experimental de requesón utilizando diferentes tipos de suero y leche se puede realizar utilizando suero obtenido como un subproducto de la fabricación de queso (Madureira y col., 2005). En la Figura 1 se muestra el proceso tradicional de fabricación de requesón. En una primera etapa, se produce la precipitación térmica de las proteínas de suero dulce en tanque de doble pared (100 L) calentado por vapor generado por la quema de gas y con control de la temperatura y la tasa de agitación. En cada lote la cuajada resultante se inocula con la cepa bacteriana de interés en una proporción del 10 % (v/v) (ca. 10^7 ufc/g) pues, como ya se ha comentado anteriormente, el producto probiótico final debe contener al menos 10^7 ufc/g de bacterias probióticas en el momento de su consumo (FAO, 2001).

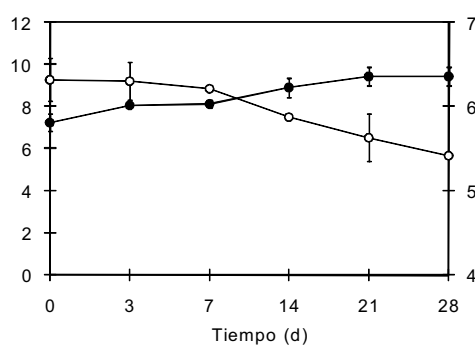
Para mejorar las características organolépticas del producto final se pueden añadir diversos aditivos que darán lugar a matrices dulces (azúcar, aloe vera, fresa y chocolate) o saladas (sal, xantana y hierbas). A continuación, y antes de ser refrigeradas, las matrices se mezclan vigorosamente con la ayuda de una batidora eléctrica para obtener una textura homogénea y suave (Madureira y col., 2008).

2.2. Viabilidad de cepas probióticas en diferentes matrices de requesón

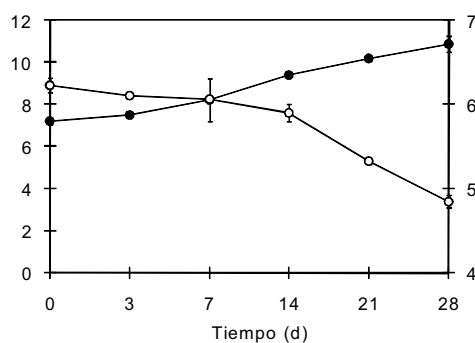
En un primer estudio de investigación la viabilidad de varias cepas de bacterias probióticas (géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) se evaluaron en una matriz de queso de lactosuero mediante la inclusión de aditivos antes de la coagulación de la proteína (Madureira y col., 2005a). La viabilidad de todas las bacterias estudiadas en el requesón a lo largo de 28 días de almacenamiento refrigerado estuvieron, en general, dentro de límites aceptables manteniendo o aumentando su número de células viables (*Lactobacillus. acidophilus* y *Lactobacillus paracasei* cepa *paracasei* LAFTI® L26). En la Figura 2 se representa la viabilidad y el perfil de acidificación de

Lactobacillus paracasei cepa *paracasei* LAFTI® L26 en las matrices de requesón natural, dulce y salado. El tipo de matriz (natural o con el añadido de azúcar o sal) fue

i.



ii.



iii.

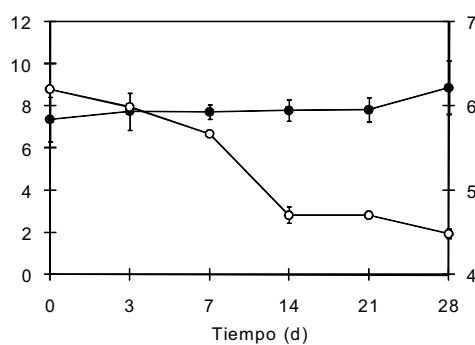


Figura 2 .Valores medios ($\pm$ desviación estándar) del número de células viables (log ufc/g) y la acidificación (como unidades de pH) de *Lactobacillus paracasei* LAFTI® L26 inoculado en queso de suero natural (i), con sal (ii) o con azúcar añadido (iii), y almacenadas a 7 °C durante 28 días (adaptado a partir de los datos de Madureira y col., 2005a).

el factor más importante que afectó a la viabilidad de las cepas bacterianas. Las matrices naturales y con azúcar fueron mejores que las matrices saladas para el crecimiento de *Bifidobacterium animalis* cepa Bo, *Lactobacillus acidophilus* cepa Ki y *Bifidobacterium animalis* cepa LAFTI®B94 (datos no mostrados).

La inclusión de aditivos también produce matrices con mayor producción de ácido láctico. La presencia de aditivos es determinante para la evolución de la proteólisis y la glicólisis, siendo estas dos actividades muy importantes para la textura y aceptación sensorial de las matrices. Como era de esperar, la actividad proteolítica es baja debido a las bajas temperaturas durante el almacenamiento, el corto tiempo de almacenamiento y, sobre todo, a la naturaleza de la matriz ya que las proteínas están menos disponibles para la hidrólisis porque forman una fase separada (sólida) y se encuentran en estado agregado (lo que obstaculiza el acceso a las proteinasas bacterianas). Hay evidencias de que las matrices que sufren menor proteólisis son más firmes (por ejemplo, las matrices con azúcar y chocolate), mientras que las matrices con mayor proteólisis (por ejemplo, con mermelada o con sal) son, a su vez, más suaves, menos adhesivas y más cohesionadas (Madureira y col., 2008).

3. Supervivencia de las bacterias probióticas incorporadas en queso de suero y sometidas a las condiciones que prevalecen en el tracto gastrointestinal

Aunque el lactosuero es una matriz interesante para incorporar cepas probióticas y servir como vector de transmisión, es necesario que las cepas probióticas incorporadas en las matrices de lactosuero sobrevivan el paso por el tracto gastrointestinal y que sean capaces de colonizar el intestino con el fin de asegurar un beneficio al consumidor (Havenaar y col., 1992). Este requisito plantea un importante desafío para las cepas, ya que se enfrentarán a las condiciones adversas del jugo gástrico, las enzimas digestivas y de las sales biliares.

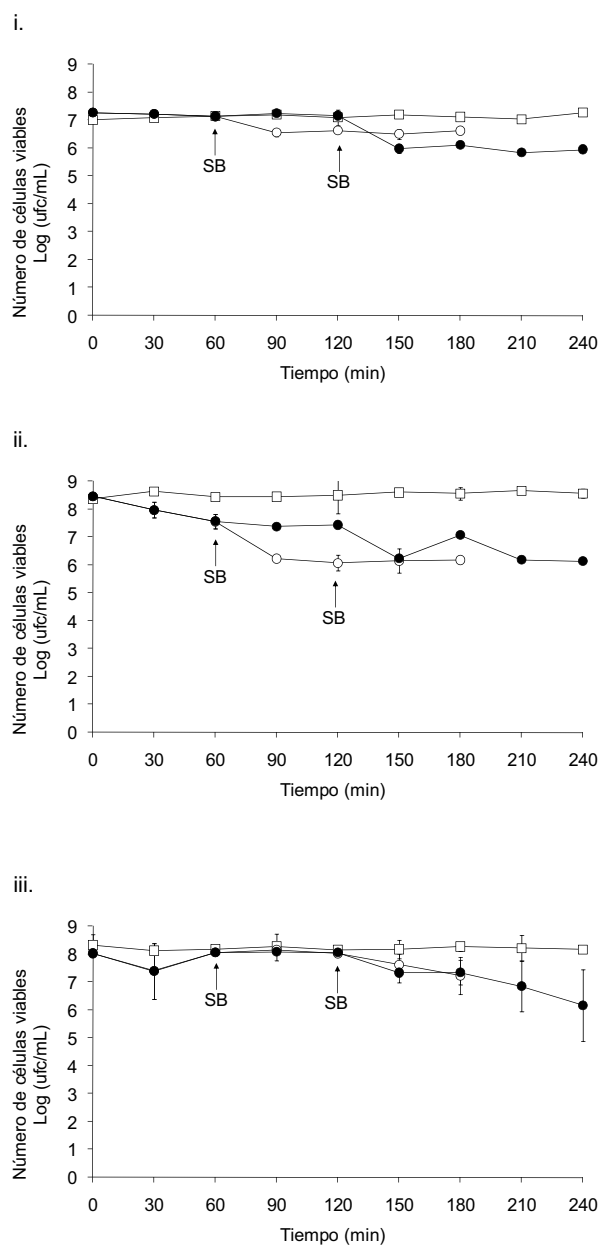


Figura 3. Valores medios ($\pm$ desviación estándar) del número de células viables (log ufc/g) de (i) *Bifidobacterium animalis* cepa Bo, (ii) *Bifidobacterium animalis* cepa Bb-12 y (iii) *Lactococcus brevis* cepa LMG 6906 cuando se exponen durante 60 minutos a jugo gástrico artificial y 120 minutos a 0,3% sales biliares ($\circ$), durante 120 minutos a jugo gástrico artificial y 120 minutos a 0,3% sales biliares ($\bullet$). Muestras control realizadas a 240 minutos ($\square$) (adaptado de Madureira y col. 2005b).

Recientemente se ha estudiado la supervivencia de cepas de *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. animalis* y *L. brevis* en queso de suero modelo exponiéndolas a las condiciones que normalmente se encuentran en el tracto gastrointestinal: exposición al jugo gástrico simulado (con un pH bajo y pepsina) seguido por la adición de sales biliares (Madureira y col., 2005b).

La resistencia de las cepas probióticas a su paso por el tracto gastrointestinal cuando se encuentran integradas en una matriz de queso de suero es, al parecer, dependiente de cada cepa. Los mejores perfiles de viabilidad a lo largo de todo el período de exposición a la combinación de jugo gástrico artificial y sales biliares se registraron para *L. brevis*, *B. animalis* cepa Bo y *B. animalis* cepa Bb-12 (Figura 3). *L. acidophilus* LAFTI®L10 y *L. acidophilus* cepa Ki resistieron la exposición al jugo gástrico artificial, pero revelaron diferentes comportamientos en presencia de sales biliares ya que la disminución del número de células viables puede comprometer su viabilidad. *L. paracasei* LAFTI®L26 y *B. animalis* LAFTI®B94 fueron los menos resistentes a los jugos gástricos artificiales.

Varios parámetros pueden determinar la supervivencia de las cepas probióticas a su paso por el tracto gastrointestinal superior: el grado de acidez del estómago y el período de exposición así como la concentración de sales biliares y el período de exposición a ellas. Sin embargo, para confirmar todos estos resultados obtenidos en estudios *in vitro* son necesarios estudios *in vivo* que permitan el análisis microbiológico de las heces después de la ingestión de alimentos inoculados con las cepas en estudio.

4. Incorporación de bacterias probióticas en el queso de suero para el control de la contaminación. Incremento de la seguridad microbiológica

Además del control que se ejerce sobre la microflora intestinal a través de la colonización de la parte inferior del intestino por parte de las bacterias probióticas,

resulta también de gran interés la actividad antimicrobiana frente a patógenos transmitidos por los alimentos y a bacterias contaminantes presentes en ellos. Las bifidobacterias son capaces de: (i) producir ácidos orgánicos, los cuales a través de un descenso de pH pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, (ii) producir peróxido de hidrógeno el cual posee también propiedades antimicrobianas, y (iii) sintetizar bacteriocinas u otros compuestos de defensa que pueden inducir respuestas inmunológicas deseadas (Velraeds y col., 1996). Estudios *in vitro* han demostrado que *Lactobacillus* spp. poseen actividad inhibitoria frente a microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (de Vuyst y col., 2004), mientras que *Bifidobacterium* spp. son activas frente a *Listeria monocytogenes* (Bevilacqua y col., 2003).

Los patógenos presentes en los alimentos se han considerado responsables de un gran número de enfermedades ocasionadas por el consumo de productos lácteos frescos, especialmente en países del sur de Europa. El hecho que los quesos de suero fresco de leche posean un pH y un contenido de humedad relativamente elevado, además de un relativamente bajo contenido de sal, les hace particularmente susceptibles a la descomposición microbiana. Este deterioro es impulsado principalmente por mohos y levaduras, así como por miembros de los géneros bacterianos *Pseudomonas* y *Staphylococcus* y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Pintado y Malcata, 2000a, b).

En los intentos de elaborar un queso de suero de leche que sea más seguro para el consumo humano la actividad antimicrobiana de las bacterias probióticas puede ser aprovechada. Por tanto, se hacen necesarios más estudios con el fin de evaluar el grado de protección que podrían ofrecer estos microorganismos.

La actividad antimicrobiana de *L. acidophilus* LAFTI®L10 y *B. animalis* LAFTI®B94, frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* inoculadas a tres diferentes

niveles, (10^3 - 10^4 , 10^4 - 10^6 y 10^6 - 10^8 ufc/g) ha sido recientemente evaluada (Madureira y col., resultados no publicados) (ver Figura 4). En general, se observa una mayor

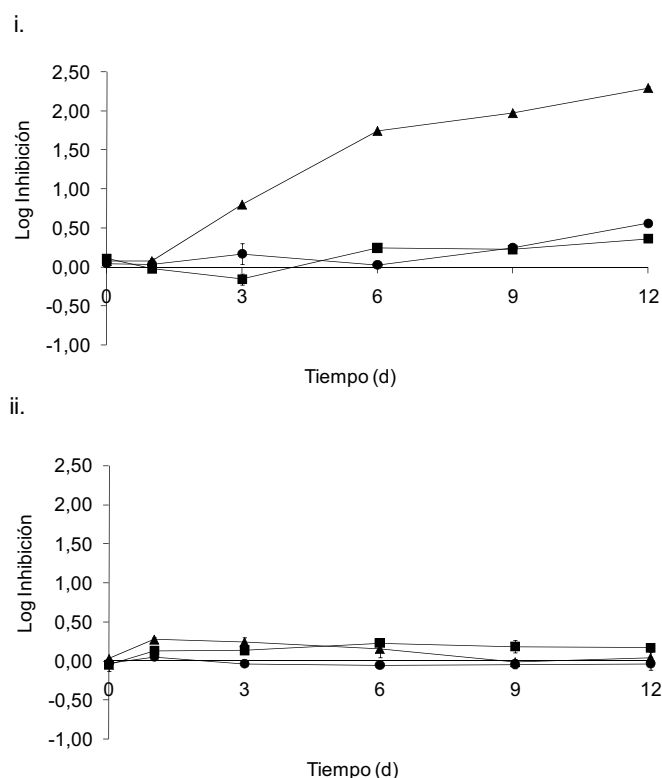


Figura 4. Evolución de la inhibición (log) $\pm$ desviación estándar para i), *Pseudomonas aeruginosa* y ii) *Listeria monocytogenes* inoculadas a los niveles 10^6 - 10^8 ufc/g (●), 10^4 - 10^6 ufc/g (■) y 10^3 - 10^4 ufc/g (▲) de *Bifidobacterium animalis* LAFTI® B94 (Madureira y col., resultados no publicados).

inhibición de patógenos y bacterias contaminantes de los alimentos por parte de *B. animalis* que por parte de *L. acidophilus*. Sin embargo, tales propiedades sólo se observan cuando el inóculo se realiza al nivel más bajo, ya que a los niveles más altos de inóculo *L. acidophilus* provocó una mayor inhibición. Concretamente, la mayor inhibición por parte de *B. animalis* se observó frente a *P. aeruginosa* a los tres niveles de inóculo. Asimismo, la menor inhibición se detectó frente a *L. monocytogenes* con el inóculo más alto, frente a *E. coli* con el inóculo a nivel intermedio y frente a *L.*

monocytogenes con el nivel de inóculo más bajo. La inhibición más significativa de *L. acidophilus* se observó frente a *L. monocytogenes* con el inóculo más alto, frente a *S. aureus* con el inóculo a nivel intermedio y frente a *S. enteritidis* con el inóculo más bajo.

5. Exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus acidophilus*

Las bacterias del ácido láctico (LAB) se utilizan en la industria alimentaria para la fabricación de varios productos fermentados. En la industria láctea, las LAB son ampliamente empleadas debido a la capacidad de ciertas cepas para mejorar el sabor y la textura de los productos lácteos. Algunas LAB, además de ser consideradas microorganismos probióticos, producen exopolisacáridos (EPS) que o bien excretan al medio de cultivo (goma) o permanecen unidos a la pared celular bacteriana formando de esta manera el EPS capsular (Sutherland, 1972). El interés en los EPS ha aumentado significativamente en los últimos años debido a su utilización como aditivos en una amplia variedad de productos alimenticios donde actúan como espesantes, estabilizantes, emulsionantes o gelificantes (Kimmel y col., 1998). Además de los beneficios tecnológicos, algunos EPS producidos por las LAB han demostrado efectos fisiológicos beneficiosos en el consumidor. Se ha especulado que el aumento de la viscosidad de los alimentos que contienen EPS provoca un mayor tiempo de residencia del alimento en el tracto gastrointestinal, lo cual podría favorecer su colonización por parte de las bacterias probióticas (German y col., 1999; Kaur y col., 2002; Ouwehand y col., 2002). Entre los efectos fisiológicos beneficiosos para la salud humana destacan la capacidad para disminuir los niveles de colesterol, la actividad anticancerígena, inmunomodulatoria, antitumoral y sus efectos prebióticos (Harris y Ferguson, 1993; Cummings y Englyst, 1995; Kitazawa y col., 1998; Chabot y col., 2001; Dal Bello y col., 2001; Korakli y col., 2002; Pigeon y col., 2002).

En los estudios de la producción de EPS por parte de las LAB se utilizan en muchos casos medios tan complejos como los de Man Rogosa y Sharpe (MRS), All Purpose Tween (ATP) y medios sintéticos (de leche enriquecida por ultrafiltración o suero de queso). La composición del medio de cultivo es un factor muy importante en la producción de EPS, y algunos nutrientes complejos del medio (por ejemplo, extracto de carne, peptona y extracto de levadura) pueden interferir en el análisis de sus monómeros y su estructura (Degeest y col., 2001; Kimmel, 1998a; Laws y col., 2001).

6. El crecimiento bacteriano y la producción de exopolisacáridos

La cepa, su condición y el medio de cultivo empleado influyen en la composición y cantidad de EPS producido por una determinada especie. En particular, la fuente de hidrato de carbono desempeña un papel importante en la cantidad de EPS producido y también puede afectar a la propia composición del EPS (Looijesteijn y col., 1999). Los EPS son normalmente producidos a niveles de 10-1000 mg/L y se caracterizan por su elevado peso molecular (por encima de 10^6 Da) (Duboc y Mollet, 2001). La biosíntesis y secreción del EPS por parte de las LAB se realiza durante diferentes fases del crecimiento y la cantidad y el tipo de polímero está influenciado por las condiciones de crecimiento. Se ha evaluado la capacidad de producción de EPS de dos cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus* LAFTI®L10 y *L. acidophilus* ATTC 4356) utilizando como medio de fermentación MRS con 20 g/L de lactosa y suero de leche. Las diversas fracciones del EPS (EPS1 y EPS2) y el sobrenadante (SP1 y SP2) (normalmente rechazados) se analizaron con el fin de evaluar las posibles interferencias durante la purificación del EPS (Degeest y De Vuyst, 1999). El método empleado es capaz de distinguir entre dos fracciones de EPS, una de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular.

Tabla 3- Crecimiento bacteriano, producción total de EPS, EPS en masa seca (EPS1 y EPS2) y concentración de proteínas totales obtenidos a partir de un cultivo de *L. acidophilus* LAFTI® L10 en MRS suplementado con lactosa.

Tiempo (h)	DO 650	Log (ufc/mL) ±SD ^e	EPS1 ^a (mg /L) ±SD ^e	EPS2 ^b (mg/L) ±SD ^e	EPS1 masa ^c (mg/g) ±SD ^e	EPS2 Masa seca ^d (mg/L) ±SD ^e	Proteína en EPS1 (mg/L)	Proteína en EPS2 (mg/L)
0	0.3	7.09±0.10	297±7	118±12	3.5±0.1	2.5±0.1	169	128
6	0.86	8.36±0.01	343±35	153±26	4.0±0.2	2.3±0.1	247	32
24	5.41	8.43±0.02	265±18	116±20	3.6±0.2	0.7±0.0	158	22

^aEPS 1= Exopolisacárido después de la primera precipitación con etanol; ^bEPS 2= Exopolisacárido después de la segunda precipitación con etanol; ^cEPS 1= Exopolisacárido masa seca después de la primera precipitación con etanol; ^dEPS 2= Exopolisacárido masa seca después de la segunda precipitación con etanol; ^eSD= Desviación estándar (n=2); DO = Densidad óptica.

Table 4- Crecimiento bacteriano, producción total de EPS, EPS en masa seca (EPS1 y EPS2) y concentración de proteínas totales obtenidos a partir de un cultivo de *L. acidophilus* ATCC 4356 en MRS suplementado con lactosa.

Tiempo (h)	DO 650	Log (ufc/mL) ±SD ^e	EPS1 ^a (mg /L) ±SD ^e	EPS2 ^b (mg/L) ±SD ^e	EPS1 masa ^c (mg/g) ±SD ^e	EPS2 Masa seca ^d (mg/L) ±SD ^e	Proteína en EPS1 (mg/L)	Proteína en EPS2 (mg/L)
0	0.22	7.57±0.00	292±2	114±8	3.6±0.5	2.8±0.3	192	22
6	1.29	8.59±0.04	336±12	141±7	3.9±0.5	2.5±0.1	220	22
24	3.64	8.67±0.04	316±7	118±16	3.8±0.5	0.4±0.9	215	51

^aEPS 1= Exopolisacárido después de la primera precipitación con etanol; ^bEPS 2= Exopolisacárido después de la segunda precipitación con etanol; ^cEPS 1= Exopolisacárido masa seca después de la primera precipitación con etanol; ^dEPS 2= Exopolisacárido masa seca después de la segunda precipitación con etanol; ^eSD= Desviación estándar (n=2); DO = Densidad óptica.

Estudios realizados con las mismas cepas a las 24 h de fermentación (Pintado y col., 2005), revelaron que las características de productividad del EPS fueron similares (Tabla 3 y 4). Sin embargo, la cantidad de EPS disminuyó con el grado de purificación como se esperaba. Los niveles de EPS1 a las 24 horas fueron 265 mg/mL y 316 mg/L y 116 mg/L y 118 mg/L para EPS2 para *L. acidophilus* LAFTI[®]L10 y *L. acidophilus* ATCC 4356, respectivamente. Esta reducción puede explicarse debido a la pérdida de EPS1 que no es totalmente precipitado en la segunda fase de precipitación y por lo tanto se mantiene en el sobrenadante SP2, o debido a que los “pellets” de EPS se pierden fácilmente durante el proceso de purificación. El nivel máximo de EPS se observó a las 6 horas de fermentación, mientras hubo una reducción en el nivel de EPS al final del período de incubación. La reducción en la producción de EPS puede ser debido a la degradación enzimática (actividad de glicohidrolasas que progresivamente destruyen el polímero), el cambio en los parámetros físicos del medio de cultivo o modificaciones reversibles de ADN que resultan en diferentes tipos de células con capacidad para producir diferentes tipos de EPS (Cerning y col., 1988; Gancel y Novel, 1994; De Vuyst y col., 1998; Pham y col., 2000).

Estos resultados indican que los ingredientes complejos del medio MRS o del suero pueden interferir en la cuantificación del EPS como anteriormente habían sugerido Kimmel y Roberts (1998). Ambas cepas crecieron bien en los medios de cultivo, con perfiles de crecimiento similares durante las 24 h (Figura 5). Estos valores son del mismo orden de magnitud que los descritos en otros trabajos utilizando *L. acidophilus* LAFTI[®]L10 (Pintado y col., 2003 y 2004), que revelaron que la fase estacionaria de crecimiento se produce entre las 12 h y las 24 h y que en el mismo período la producción de EPS es máxima.

El principal azúcar que se convierte en ácido láctico es la glucosa. Este azúcar se transforma en ácido láctico por la vía glicolítica homofermentativa pasando de 18 g/L al inicio de la fermentación a 6 g/L a las 24 h en el caso de *L. acidophilus* LAFTI[®]L10, y

de 18 g/L a 8 g/L para *L. acidophilus* ATCC4356. La lactosa (18 g/L) sólo se consumió cuando los niveles de glucosa fueron muy bajos para ambas cepas (Figura 5). El contenido de ácido láctico obtenido a las 24 h fue muy alto, 18 g/L para *L. acidophilus* LAFTI® L10 y 12 g/L para *L. acidophilus* ATCC4356. Cuando se analizó el medio de

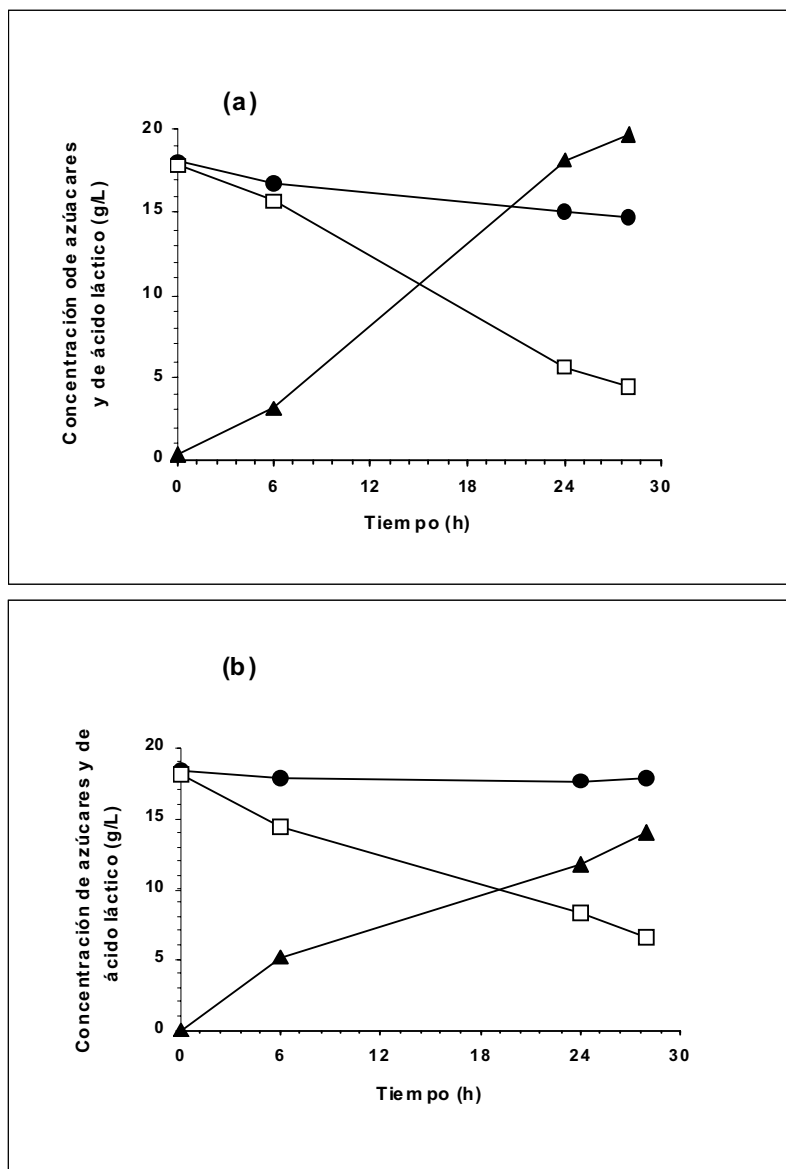


Figura 5. Consumo/producción de lactosa (?), glucosa (?) y ácido láctico (?) en un cultivo de (a) *L. acidophilus* LAFTI® L10 y (b) *Lb. acidophilus* ATCC 4356.

fermentación no se encontraron otros ácidos (ácido cítrico, ácido fórmico, ácido succínico o ácido acético).

En la literatura se pueden encontrar importantes diferencias cuando se cuantifican los EPS incluso para las mismas cepas. Esta divergencia probablemente se debe a los diferentes medios elegidos para la producción de EPS, las diferentes técnicas de aislamiento empleadas, los métodos utilizados para la cuantificación y el grado de pureza obtenido (Ruas-Madiedo y de Los Reyes-Gavilán, 2005; Behare y col., 2009). La cantidad de EPS lácteos (0,1-5 g/L) producidos por las LAB son limitados en comparación con la producción de goma xantana (30-50 g/L) (Degeest y col., 2001). Aunque muy bajas concentraciones deberían ser suficientes para detectar los beneficios de la EPS en los alimentos, la producción de EPS podría mejorarse a través de la manipulación genética. Esta técnica se emplearía para modificar las actividades de cualquiera de las enzimas que intervienen en la biosíntesis o para controlar la fisiología microbiana (Laws y col., 2001). El uso de suero de leche como medio de fermentación presenta la oportunidad de crear productos con un valor añadido. La utilización de suero de leche o permeado de suero de leche como medio de fermentación reduciría su contenido en lactosa, lo que implicaría una disminución de la demanda biológica de oxígeno (BDO) así como una reducción del coste de eliminación (Kilara y Patel, 1992).

El EPS producido *in situ* por las LAB incorporadas en productos con suero de leche podría resultar en un producto final seguro y natural, con la ventaja de la revalorización de este subproducto. Estos EPS podrían tener un impacto importante en el desarrollo de nuevos productos alimenticios (tanto fermentados como no fermentados), especialmente para mejorar su textura, su estabilidad y su capacidad de retención de agua, además de las propiedades saludables que estos EPS pudieran tener.

Conclusiones y perspectivas futuras

Las matrices de lactosuero son buenos vehículos para aquellas especies de bacterias probióticas en donde se han obtenidos buenos perfiles de viabilidad para un determinado número de cepas. El uso de tales cepas también aumenta la vida útil de este producto debido a la posible inhibición de la contaminación microbiana. El producto final es un producto bi-funcional ya que contiene proteínas de suero de leche y bacterias probióticas, ambas con funciones biológicas ya demostradas. En general, se ha observado que las cepas bacterianas consiguen sobrevivir procesos de simulación de las condiciones gastrointestinales. Sin embargo, aún son necesarios estudios *in vivo* para confirmar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*.

Los quesos de suero con microorganismos probióticos presentan una elevada viabilidad de las cepas y un alto contenido en ácido láctico producido por estas bacterias. Sin embargo, la elevada presencia de ácido se considera negativa desde un punto de vista sensorial y se tienen que buscar diferentes mecanismos para disminuir su concentración. Una de las formas podría ser el encapsulamiento de las cepas utilizando también proteínas de suero de leche, lo que mantendría los microorganismos probióticos viables y en número necesario pero sin actividad metabólica, protegiendo las características organolépticas del producto.

La incorporación directa de EPS en distintos productos lácteos o su producción *in situ*, utilizando cepas de LAB como *L. acidophilus* tiene una influencia positiva en la funcionalidad y propiedades biológicas de estos productos. La producción de EPS por LAB probióticas tiene un enorme potencial como cultivos funcionales que podrían sustituir a muchos de los aditivos comerciales actualmente en uso.

Referencias

- Behare, P. V., Rameshwar, S., Kumar, M., Prajapati, J. B., Singh, R. P. 2009. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review. *Journal of Food Science and Technology* 46: 1-11.
- Bevilacqua, L., Ovidi, M., di Mattia, E., Trovatielli, L. D., Canganella, F. 2003. Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonist activities against potential bacterial pathogens. *Microbiology Research* 158: 179-185.
- Blanchette, L., Roy, D., Bélanger, G., Gauthier, S.F. 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science* 79: 8-15.
- Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C. and Hill, R. L. 1970. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry* 10: 4570-4582.
- Chabot, S., Yu, H. L., De Leseleuc, L., Cloutier, D., van Calsteren, M. R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D. 2001. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* RQ-595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes. *Lait* 81: 683-697.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J., Landom, M. 1988. Exocellular polysaccharides production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology. Letters* 10: 255.
- Cummings, J. H., Englyst, H. N. G. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition* 61: 938S-945S.
- Dal Bello, F. D., Walter, J., Hertel, C., Hammes, W. P. 2001. In vitro study of probiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and nondigestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *System Applied Microbiology* 24: 232-237
- Daigle, A., Roy, D., Bélanger, G., Vuilleumard, J. C. 1997. Production of hard-pressed cheese (Cheddar cheese-like) using cream fermented by *Bifidobacterium infantis* ATCC 27920 G. (Abstr.) *Journal of Dairy Science* 80 (Sup. 1):103.
- Dave, R. I., Shah, N. P. 1998. Ingredients supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *Journal of Dairy Science* 81: 2804-16.
- De Vuyst, L., Makras, L., Avonts, L., Holo, H., Yi, Q., Servin, A., Fayol-Messaoudi, D., Berger, C., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Sgouras, D., Martinez-Gonzales, B., Panayotopoulou, E., Mentis, A., Smarandache, D., Savu, L., Thonart, P., Nes, I.

2004. Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria, the first results of the international European research project PROPATH of the PROEUHEALTH cluster. *Microbiology Ecology Health Disease* 16: 125-130.
- De Vuyst, L., Vanderveken, F., van de Ven, S., Degeest, B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1059-1068.
- De Wit, J. N. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science* 81: 597-602.
- Degeest, B., De Vuyst, L. 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2863-2870.
- Degeest, B., Vaningelge M., F., Laws, A., De Vuyst, L. 2001 UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase activity indicates the presence of N-acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3976–3984.
- Dinakar, P., Mistry V. V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 77:2854-2864.
- Duboc, P., Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* 11: 759-768.
- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M., Harwalkar, V. R., Jenness, R. Whitney, R. M. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science* 67: 1599-1631.
- Evans, E. W. 1982. Uses of milk proteins in formulated foods. In B. J. F. Hudson, *Developments in Food Proteins*. London: Applied Science.
- FAO, 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001 [cited 2005 Dec 15]. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf.
- Furtado, M. M., Partridge, J. A., Ustunol, Z. 1993. Ripening characteristics of reduced fat cheddar cheese using heat-shocked and live *Lactobacillus casei* as adjunct culture. (Abstr) *Journal of Dairy Science* 76 (Sup.1):101.

- Gancel, F., Novel, G. 1994. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. *Journal. Dairy Science* 77: 689-695.
- Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Stanton, C. 1998. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2192-2199.
- German, B., Schiffrin, E., Reniero, R., Mollet, B., Pfeifer, A., Neeser, J. R. 1999. The development of functional foods: Lessons from the gut. *Trends in Biotechnology*, 17: 492–499.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A., de Angelkis, M. 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science* 81:37-47.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M., Grande, H. G. 1995. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk Dairy Journal* 49:71-95.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F.X. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of Dairy Science* 81:1492-1507.
- Harris, P. J., Ferguson, L. R. 1993. Dietary fibre: Its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutation Research*, 290: 97–110.
- Havenaar, R., Brink, B. T., & Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Selection of strains for probiotic use. In *Probiotics* (pp. 209-224). London: R. Fuller, ed. Chapman & Hall.
- Hekmat, S., McMahon, D. J. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science* 75:1415-22.
- Kaur, P. I., Chopra, K. Saini, A., 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science* 15: 1-9
- Kilara, A., Patel, M. T. 1992. *Whey and lactose fermentation. Whey and Lactose Processing*. Zadow J. G. Editor, Elsevier Applied Science, London, 409–448.
- Kimmel, S. Roberts, R. F. 1998a. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology* 40: 87-92.
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F., Ziegler, G. R. 1998b. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium: *Applied and Environmental Microbiology* 64: 659-664.

- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito T., Kaneko, T., Itoh, T. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Food Microbiology* 40:169-175.
- Korakli, M., Rossmann, A., Ganzle, M. G., Vogel, R. F. 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology* 92:958-965.
- Korhonen, H. 1995. Whey as raw material for development of new products for human nutrition and health, a review. In *Proceedings of NIF/NMR – seminar no. 252*, Turku, Finland, 13-15, 1, NJF – report 102, pp. 207-219.
- Kosikowski, F. V. 1982. Whey and whey foods. In Kosikowski, F. V. (ed.), *Cheese and Fermented Milk Foods*. New York, Edwards Brothers, pp. 446-469.
- Laroia, S., Martin J. H. 1991. Effect of pH on the survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Culture Dairy Production Journal* 26:13-21.
- Laws, A. P., Gu Y., Marshall, V. M. 2001. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria, *Biotechnology Advances* 19:597–625.
- Lee, Y. K., Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 6:241-245.
- Looijesteijn, P. J., Boels, I. C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5003-5008.
- Madureira, A. R., Gião, M. S., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Freitas, A. C., Malcata, F. X. 2005a. Incorporation and survival of probiotic bacteria in whey cheese matrices. *Journal of Food Science* 70 (3), M160-165.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2005b. Survival of Probiotic Bacteria in a Whey Cheese Vector Submitted to Environmental Conditions Prevailing in the Gastrointestinal Tract. *International Dairy Journal* 15:921-927.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P. & Malcata, F. X. 2007. Bovine whey proteins – overview on the main biological activities. *Food Research International* 40:1197-1211.

- Madureira, A. R., Soares, J. C., Freitas, A. C., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2008. Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI®L26. *Le lait*, 88:649-665.
- Marshall, V. M., Cole, W. M., Mabbitt, L. A. 1982. Fermentation of specially formulated milk with single strains of *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Technology* 35:143-144.
- Ouwehand, A. C., Lagström H., Suomalainen T., Salminen, S. 2002. Effect of Probiotics on Constipation, Fecal Azoreductase Activity and Fecal Mucin Content in the Elderly. *Annual Nutrition Metabolics* 46:159-162.
- Pigeon R. M., Cuesta E. P., Gilliland S. E. 2002. Binding of free bile acids by cells of yoghurt starter culture bacteria. *Journal Dairy Science* 85:2705-2710.
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J. 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 67: 33-41.
- Pintado, M. E., Lopes da Silva, J. A., Malcata F. X. 1996. Characterisation of Requeijão and technological optimisation of its manufacturing process. *Journal of Food Engineering* 30:363-376.
- Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2000a. Characterisation of whey cheese packaged under vacuum. *Journal Food Protection* 63:216-21.
- Pintado, M. E., Malcata, FX. 2000b. Optimisation of modified atmosphere packaging with respect to physicochemical characteristics of Requeijão. *Food Research International* 33:821-832.
- Pintado, M. E., Malcata, F. X. 2000c. The effect of modified atmosphere packaging on the microbial ecology in Requeijão, a Portuguese whey cheese. *Journal of Food Processing and Preservation* 24:107-124.
- Pintado, M. E., Macedo, A. C., Malcata, F. X. 2001. Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International* 7:105-116.
- Pintado, A. I. E., Barbosa, C. C. R., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2003. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus acidophilus* grown in a semi-defined medium. Poster presentation Micro'2003, Tomar, 29th November - 2nd December, Portugal.
- Pintado M. E., Gomes A. M. P., Malcata, F. X. 2004. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus acidophilus* for potential applications in fresh cheese, Poster

- presentation, IDF 2004 — *Symposium on Cheese: Ripening, Characterization & Technology*, Prague, de 21-25th March, Chec Republic.
- Pintado, A. I. E., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 2005 Evaluation of isolation method of Exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus*. Poster presentation 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu, 13-16 th April, Portugal.
- Reid G., 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied Environmental Microbiology* 65:3763-3766.
- Reuter G., 1990. Bifidobacteria cultures as components of yoghurt-like products. *Bifidobacteria Microflora* 9:107-118.
- Riordan, K. O., Fitzgerald, F. 1998. Evaluation of *Bifidobacteria* for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in cottage cheese at refrigeration temperature. *Journal of Applied Microbiology* 85:103-114.
- Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C. G. 2005. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 88:843-856.
- Shaw, S. K., White, C. H. 1994. Survival of *Bifidobacteria* in reduced fat Cheddar cheese (Abstr). *Journal of Dairy Science* 77(Sup 1):4.
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. 1998. Probiotic cheese. *International Dairy Journal* 8:491-496.
- Sutherland, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbiology and Physiology* 8: 143-213.
- Velraeds, M. C., van der Mei, H. C., Reid, G., Busscher, H. J. 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1958-1963.
- Vinderola, C. G., Prosello, W., Gilberto, D., Reinheimer, J. A. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinean Fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83:1905-1111.