



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

# Sobre a engenharia de lacticínios: probióticos e prebióticos

**F. Xavier Malcata & Ana M. Gomes**

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa  
Rua Dr. António Bernardino Almeida  
4200-072 Porto, Portugal

**Colóquio Alimentos Funcionais**  
**Ordem dos Engenheiros, Lisboa - 20 de Maio 2009**

# Agenda

- Probióticos
- Prebióticos
- Géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*: desafios tecnológicos e funcionais
- Género *Enterococcus*: desafios tecnológicos, funcionais e de segurança



# Probiótico

**“Suplemento bioactivo, que afecta benéficamente o hospedeiro (após ingestão em números viáveis suficientes), através da melhoria das propriedades da microflora indígena (i.e. melhora equilíbrio microbiano intestinal)”**

*FAO (2001)*



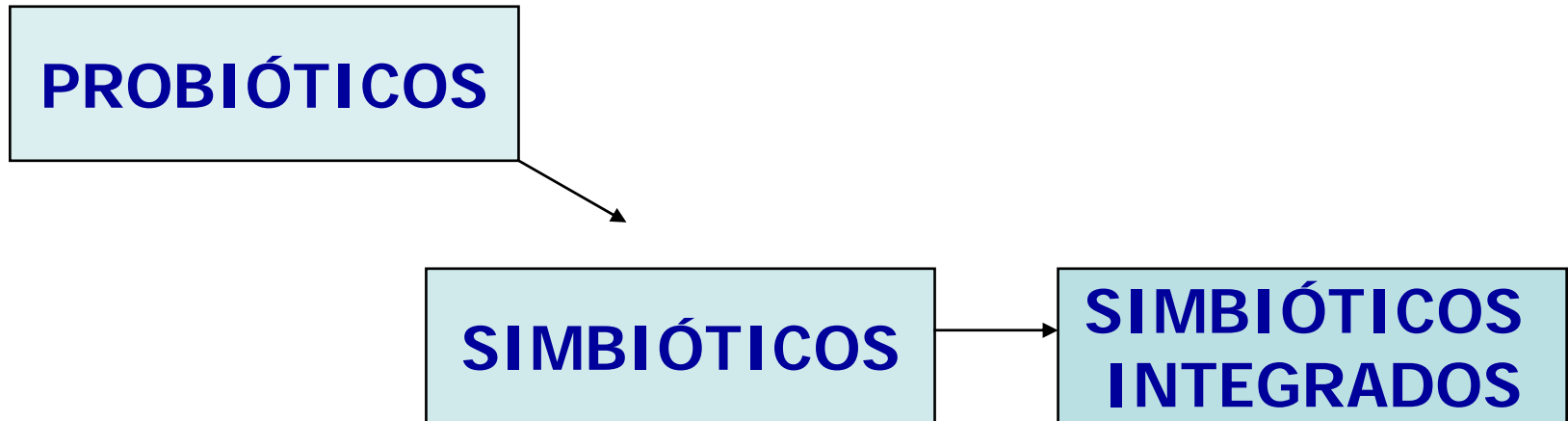
# Prebiótico

**“Ingrediente alimentar não digerível, com efeito benéfico sobre o hospedeiro, através do estímulo selectivo do crescimento e/ou actividade de uma (ou um número limitado de) espécie(s) de bactérias promotoras da saúde (i.e. melhora o equilíbrio intestinal do indivíduo)”**

*Roberfroid (1995)*



# Simbiótico



**PREBIÓTICOS**

Mistura de pró- e prebióticos que, por sinergia, tem efeitos benéficos suplementares sobre o hospedeiro



Probióticos

Simbióticos

Prebióticos

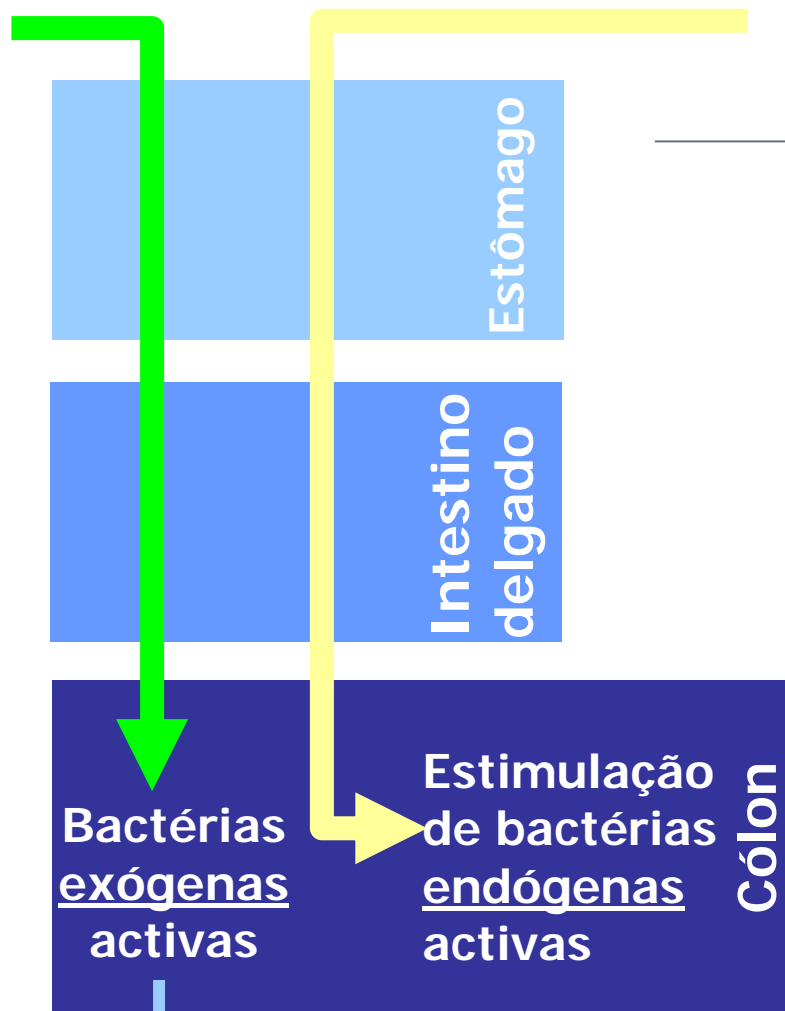
Bactérias vivas  
na dieta

Inulina e  
oligofrutose  
na dieta

Sobrevivência\*

Fixação\*  
Actividade\*

\* dependente  
da espécie



# Microrganismos probióticos

## LACTOBACILLUS

💧 55 espécies



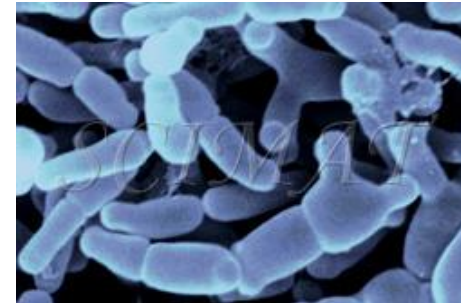
*L. acidophilus*



*L. casei*

## BIFIDOBACTERIUM

💧 30 espécies



*B. longum*



*B. breve*



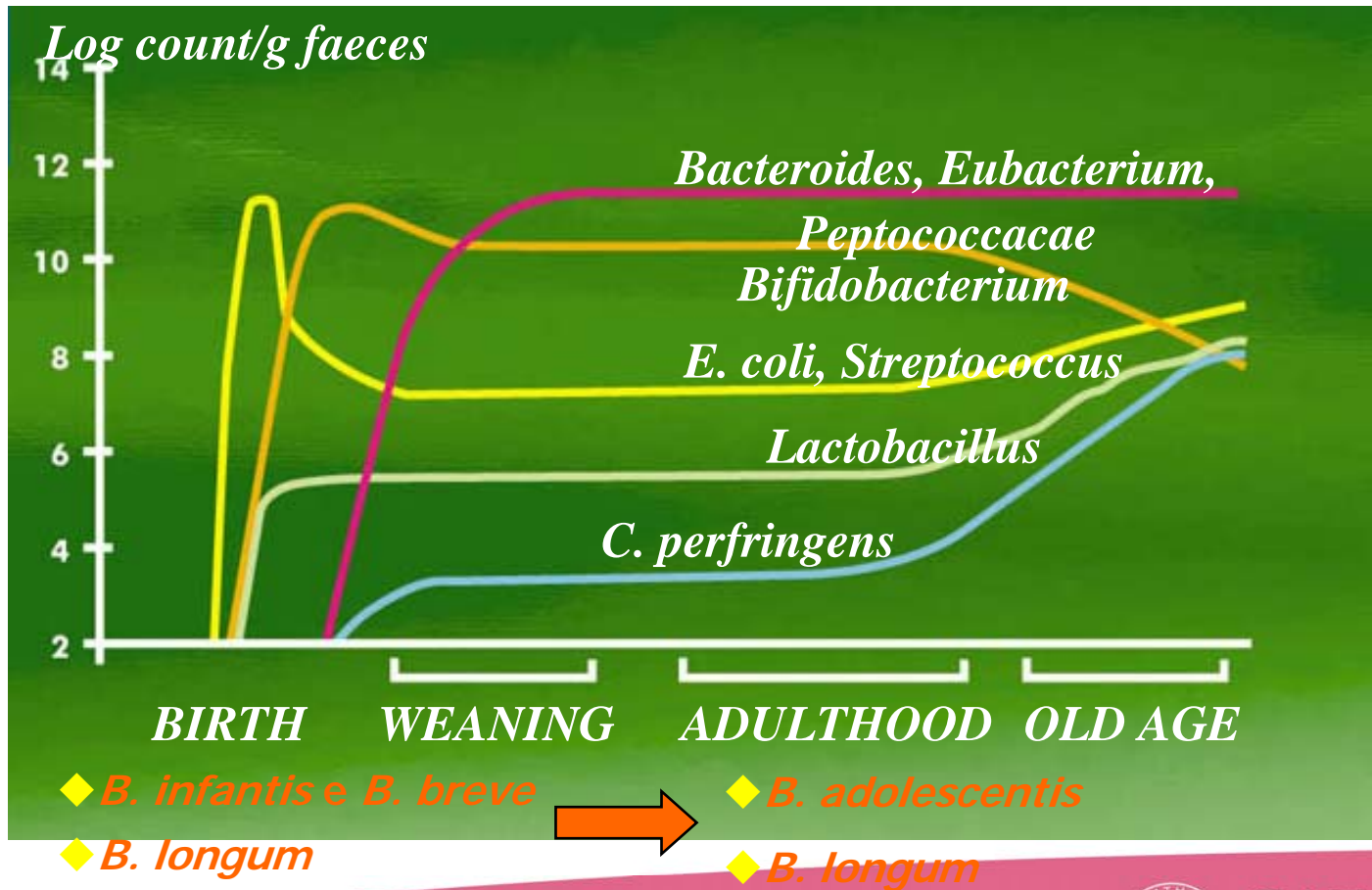
# Microrganismos probióticos

- *Lactobacillus*  
*acidophilus, casei, delbrueckii ssp. bulgaricus, gasseri, fermentum, helveticus, paracasei, plantarum, reuteri, rhamnosus, salivarius*
- *Bifidobacterium*  
*bifidum, infantis, breve, longum, lactis*
- *Streptococcus*  
*thermophilus*
- *Enterococcus*  
*durans, faecium*
- *Lactococcus*  
*lactis*
- *Saccharomyces*  
*boulardii*

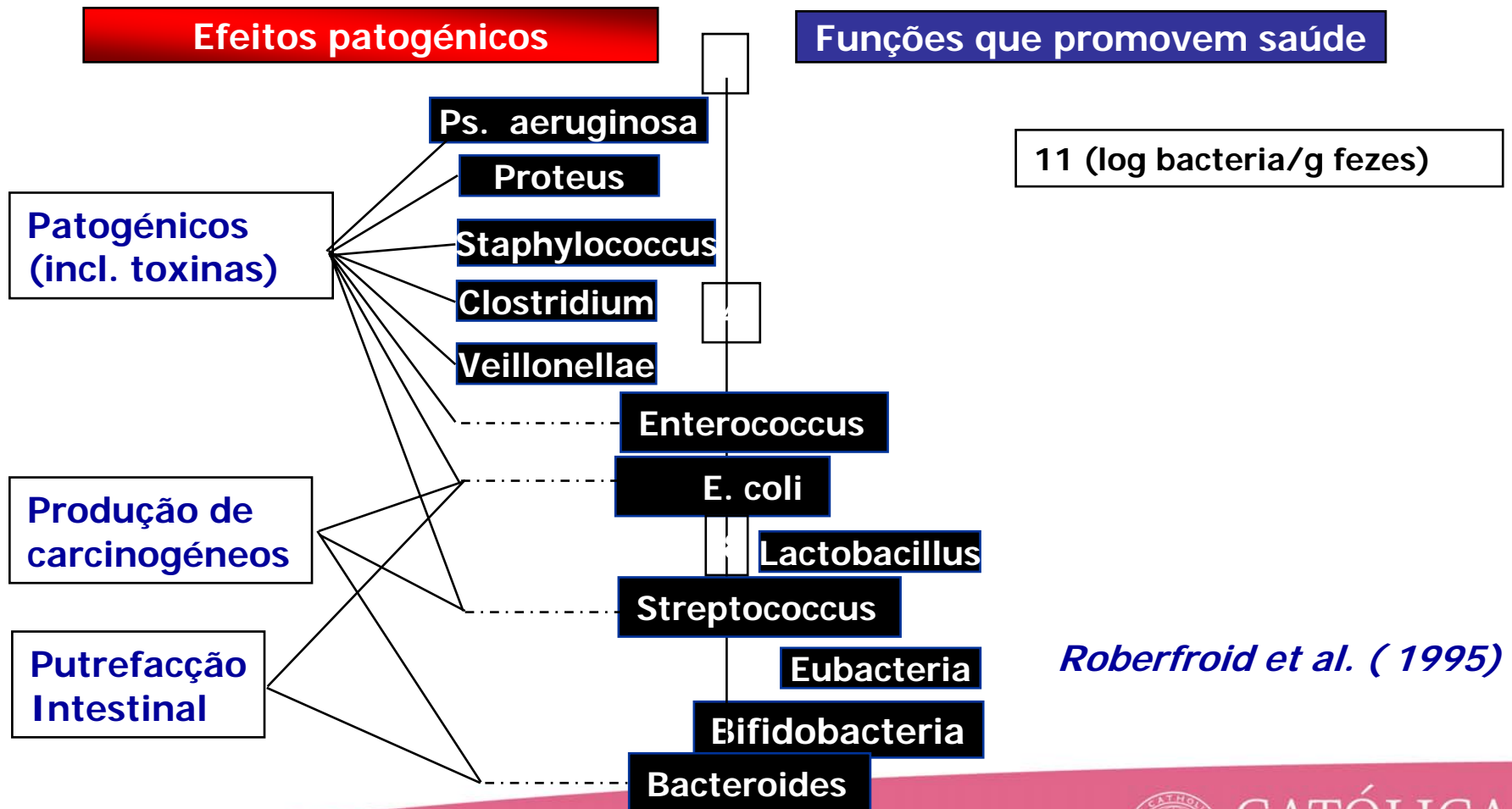


# Ecologia do tracto gastrointestinal: evolução

**Agentes probióticos** - povoam nichos ecológicos nos tractos gastrointestinal e genitourinário



# Ecologia do tracto gastrointestinal: composição e efeitos



*Roberfroid et al. (1995)*



# Função da microflora normal

- Digestão
- Produção de vitaminas
- Maturação da mucosa
- Estimulação do sistema imunitário
- Adesão
- Trânsito intestinal
- Resistência à colonização por patogéneos

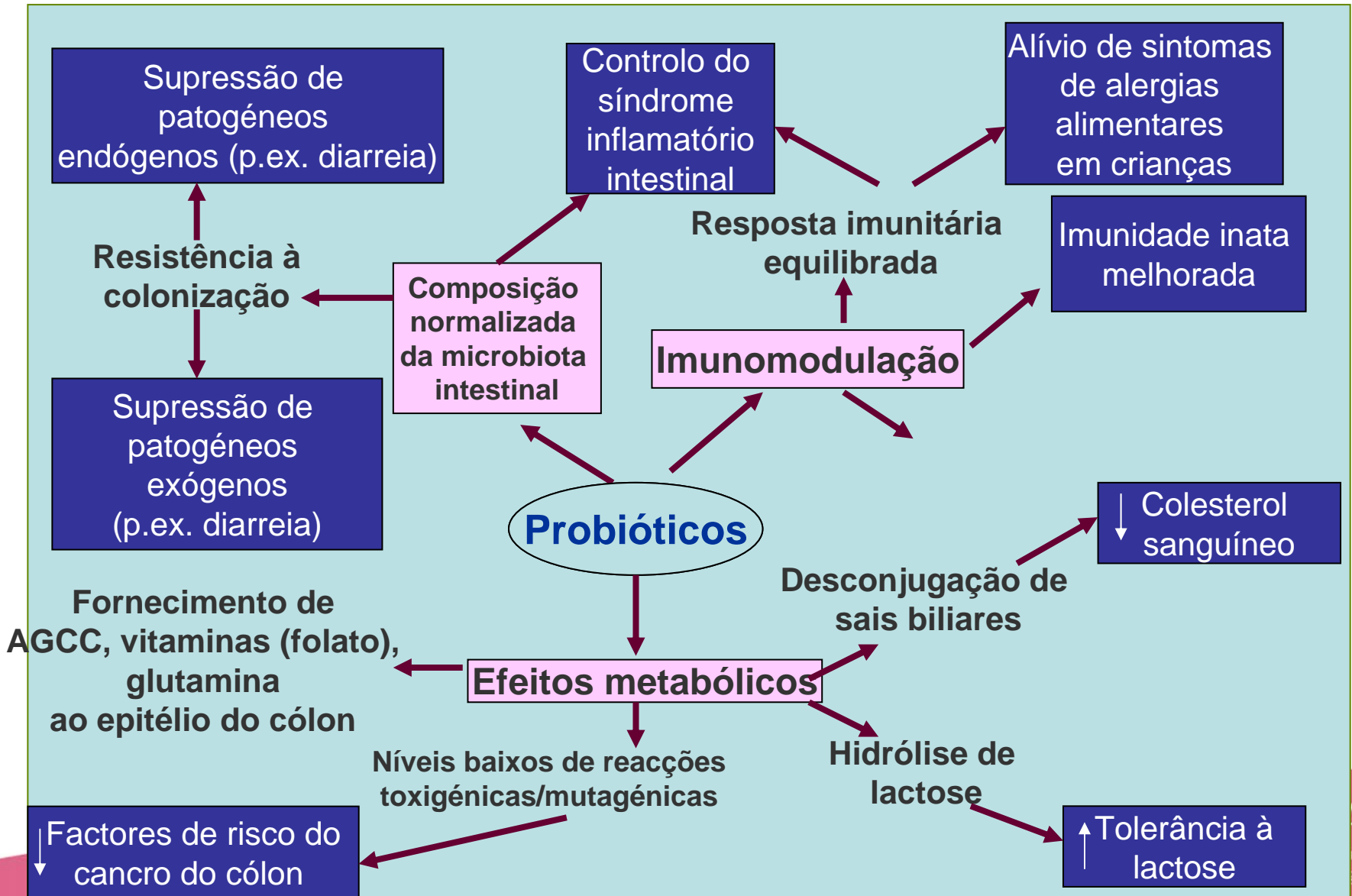


# Probióticos: benefícios

- Intolerância à lactose
- Prevenção de colonização por patogéneos
- Modulação da função imunitária
- Controlo dos níveis de colesterol no sangue
- Redução de reacções inflamatórias
- Prevenção de cancro
- Supressão de alergias alimentares
- Modificação da flora intestinal e reforço da função barreira



# Probióticos: mecanismos de acção



# Prebióticos: benefícios

- ↑ do peso fecal
- ↑ razão HDL/LDL
- ↓ pH fezes
- ↓ lípidos séricos
- ↓ obstipação
- ↑ frequência de dejectões
- ↑ *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*
- ↓ *Enterococcus* e *Clostridium*
- ↑ biodisponibilidade de Ca, Mg e Fe



# Critérios de selecção de probióticos

- Estabilidade em meio ácido e ao suco gástrico
- Tolerância aos sais biliares
- Adesão às superfícies de mucosas e persistência no tracto gastrointestinal
- Imunoestimulação, sem efeito proinflamatório
- Capacidade antagonista contra patogéneos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*
- Propriedades antimutagénicas e anticarcinogénicas
- Efeito clinicamente validado e documentado - **GRAS**



# Critérios de selecção de probióticos (cont.)

- **Propriedades organolépticas aceitáveis**
- **Resistência a fagos**
- **Capacidade de multiplicação e de acidificação durante o processo de fabrico**
- **Boa tolerância ao oxigénio do meio**
- **Viabilidade durante o processamento**
- **Estabilidade no produto ( $>10^7$  ufc/ml), durante armazenamento e distribuição**



# Critérios de selecção de prebióticos

- Não ser hidrolizado ou absorvido na parte proximal do tubo digestivo
- Ser um substrato selectivo para uma (ou um número limitado de) bactéria(s) potencialmente benéficas ou comensais no cólon
- Alterar a microflora do cólon para uma composição e/ou actividade potencialmente mais benéfica



# Pro-, pre- e simbióticos: aplicações

- Diarreia vírica aguda
- Diarreia associada a antibióticos
  - *Clostridium difficile*
- Síndrome inflamatório intestinal
- Prevenção de enterocolite necrosante
- Alergias
- Infecção por *Helicobacter pylorii*



# Efeito em distúrbios gastrointestinais

## INCIDÊNCIA DE DIARREIA AGUDA EM 779 CRIANÇAS A FREQUENTAR A CRECHE/INFANTÁRIO E A CONSUMIR LEITES FERMENTADOS



*Pedone et al. (2000)*  
*Int. J. Clin. Pract. 55:*  
*568-571*



# Efeito em distúrbios gastrointestinais

## LACTOBACILLUS GG & PREVENÇÃO DE DIARREIA INFANTIL NOSOCOMIAL [METODOLOGIA]

- Estudo duplamente cego, controlado por placebo, na Polónia
- 81 crianças hospitalizadas (1-36 meses)
- Sem diarreia ausente no momento de admissão
- Randomizado durante a permanência:
  - LGG ( $12 \times 10^9$  CFU/d)
  - Placebo

*Szajewska (2001) J. Pediatr. 138: 361-365*



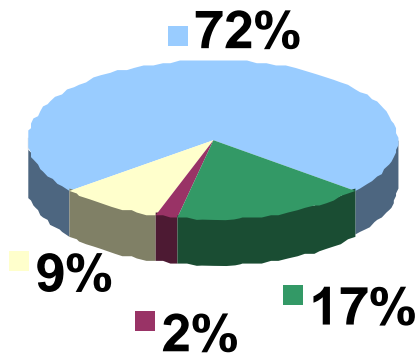
# Efeitos bifidogénicos

## OLIGOFRUTOSE

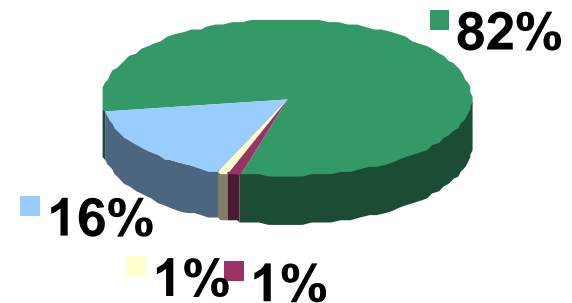
n = 8

15 g/d  
2 semanas

### Sucrose



### Oligofrutose



■ Bifidobacteria ■ Clostridium ■ Fusobacterium ■ Bacteroides

*Gibson (1995)*



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

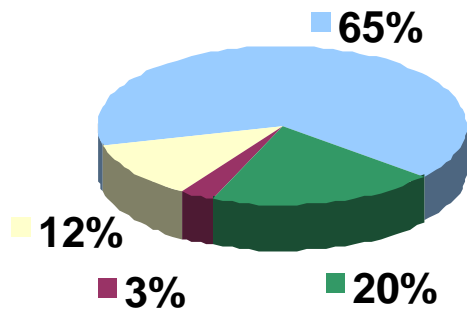
# Efeitos bifidogénicos

INULINA

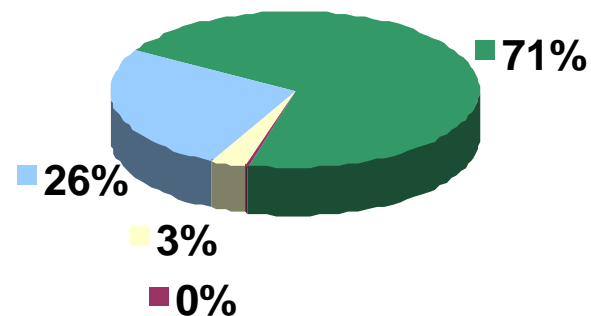
15 g/d  
2 semanas

n = 4

Pré-inulina



Pós-inulina



■ Bifidobacteria ■ Clostridium ■ Fusobacterium ■ Bacteroides

*Gibson (1995)*



CATÓLICA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

**Table 3. Summary of human studies to examine the effects of fructan supplementation on blood lipids**

Author	Subjects	Fructan	Dose	Study design	Duration	Vehicle	Significant changes observed in:	
							Blood lipids	Glucose
Yashashati <i>et al.</i> 1984	8M and 10F Type II diabetes	OFS	8 g	DB parallel	2 weeks	packed coffee drink canned coffee jelly	↓ TC ↓ LDL-C	↓ glucose
Hidaka <i>et al.</i> , 1991	37 (M and F) hyperlipidaemic	OFS	8 g	DB parallel	5 weeks	confectionery	↓ TC	NS
Canzi <i>et al.</i> 1996	12 M normolipidaemic	inulin	9 g	Sequential	4 weeks	breakfast cereal	↓ TAG ↓ TC	N/A
Luo <i>et al.</i> 1996	12 M normolipidaemic	OFS	20 g	DB crossover	4 weeks	100 g biscuits	NS	NS
Pedersen <i>et al.</i> 1997	66 F normolipidaemic	inulin	14 g	DB crossover	4 weeks	40 g margarine	NS	N/A
Davidson <i>et al.</i> 1998	21 (M and F) hyperlipidaemic	inulin	18 g	DB crossover	6 weeks	chocolate bar/paste or coffee sweetener	↓ LDL-C ↓ TC	N/A
Alles <i>et al.</i> 1999	9 M and 11 F Type II diabetes	OFS	15 g	SB crossover	3 weeks	supplement not specified	NS	NS
Brighenti <i>et al.</i> 1999	12 M normolipidaemic	inulin	9 g	Sequential	4 weeks	breakfast cereal	↓ TC ↓ TAG	NS
Jackson <i>et al.</i> 1999	54 (M and F) normolipidaemic	inulin	10 g	DB parallel	8 weeks	powder added to food and drinks	TAG	↓ insulin
Causey <i>et al.</i> 2000	12 M normolipidaemic	inulin	20 g	DB crossover	3 weeks	low-fat ice-cream	↓ TAG	NS

M, male; F, female; DB, double blind; N/A, not measured; NS, not significant; SB, single blind; TC, total cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; OFS, oligofructose; TAG, triacylglycerol

# Pre- e probióticos no mercado

- **Ease your digestive woes naturally. *Better Nutrition, Sept 1999***

**Make friends with good bacteria  
*Natural Health, March 2002***



- **Immune System Enhancement  
*Prepared Foods, July '03***



**Gut Check: Health Issues of  
the gastrointestinal system  
*Nutrition Action, April 2004***



# Pre- e probióticos no mercado

<i>Lactobacillus</i> species	Strains	<i>Bifidobacterium</i> species	Strains
<i>L. acidophilus</i>	LA-1/LA-5 (Chr. Hansen)	<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703, 94-BIM
<i>L. acidophilus</i>	NCFM (Danisco)	<i>B. bifidum</i>	Bb-11 (Chr. Hansen)
<i>L. acidophilus</i>	Lafti™, L10 (DSM)	<i>B. breve</i>	Yakult (Yakult)
<i>L. acidophilus</i>	DDS-1 (Nebraska Cultures)	<i>B. lactis</i> (reclassified as <i>B. animalis</i> )	Bb-12 (Chr. Hansen)
<i>L. acidophilus</i>	SBT-2062 (Snow Brand Milk Products)	<i>B. lactis</i>	Bb-02 (Chr. Hansen)
<i>L. acidophilus</i>	Ceska®-star A 900 (CSK)	<i>B. lactis</i>	Lafti™, B94 (DSM)
<i>L. acidophilus</i> Johnsonii	La1 (Nestlé)	<i>B. lactis</i>	DR10/HOWARU (Danisco)
<i>L. casei</i>	431 (Chr. Hansen)	<i>B. lactis</i>	Ceska®-star B 100 (CSK)
<i>L. casei</i>	Lafti™, L26 (DSM)	<i>B. animalis</i>	Essensis (Activia, Danone)
<i>L. casei</i> Immunitass	(Danone)	<i>B. laterosporus</i>	CRL 431
<i>L. casei</i> Shirota	(Yakult)	<i>B. longum</i>	BB536 (Morinaga Milk Industry)
<i>L. fermentum</i>	RC-14 (Urex Biotech)	<i>B. longum</i>	UCC 35624 (UCCork)
<i>L. helveticus</i>	LH-B02 (Chr. Hansen)	<i>B. longum</i>	SBT-2928 (Snow Brand Milk Products)
<i>L. lactis</i>	L1A (Essum AB)	<i>B. longum</i>	Bb46 (Chr. Hansen)
<i>L. paracasei</i>	CRL 431 (Chr. Hansen)		
<i>L. plantarum</i>	299v (Probi AB)		
<i>L. reuteri</i>	SD2112/MM2 (Biogaia)		
<i>L. rhamnosus</i>	GG (Valio and Chr. Hansen)		
<i>L. rhamnosus</i>	GR-1 (Urex Biotech)		
<i>L. rhamnosus</i>	LB21 (Essum AB)		
<i>L. rhamnosus</i>	271 (Probi AB)		



# Pre- e probióticos no mercado

- Sector de iogurte/leites fermentados como motor chave de crescimento
- Importância crescente entre os alimentos funcionais
- Desenvolvimento adequado ao consumidor preocupado com estado geral de saúde
- Conveniência e funcionalidade



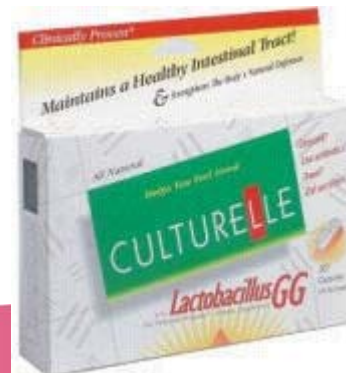
*Euromonitor (January 2004): Food Processing 2004*



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

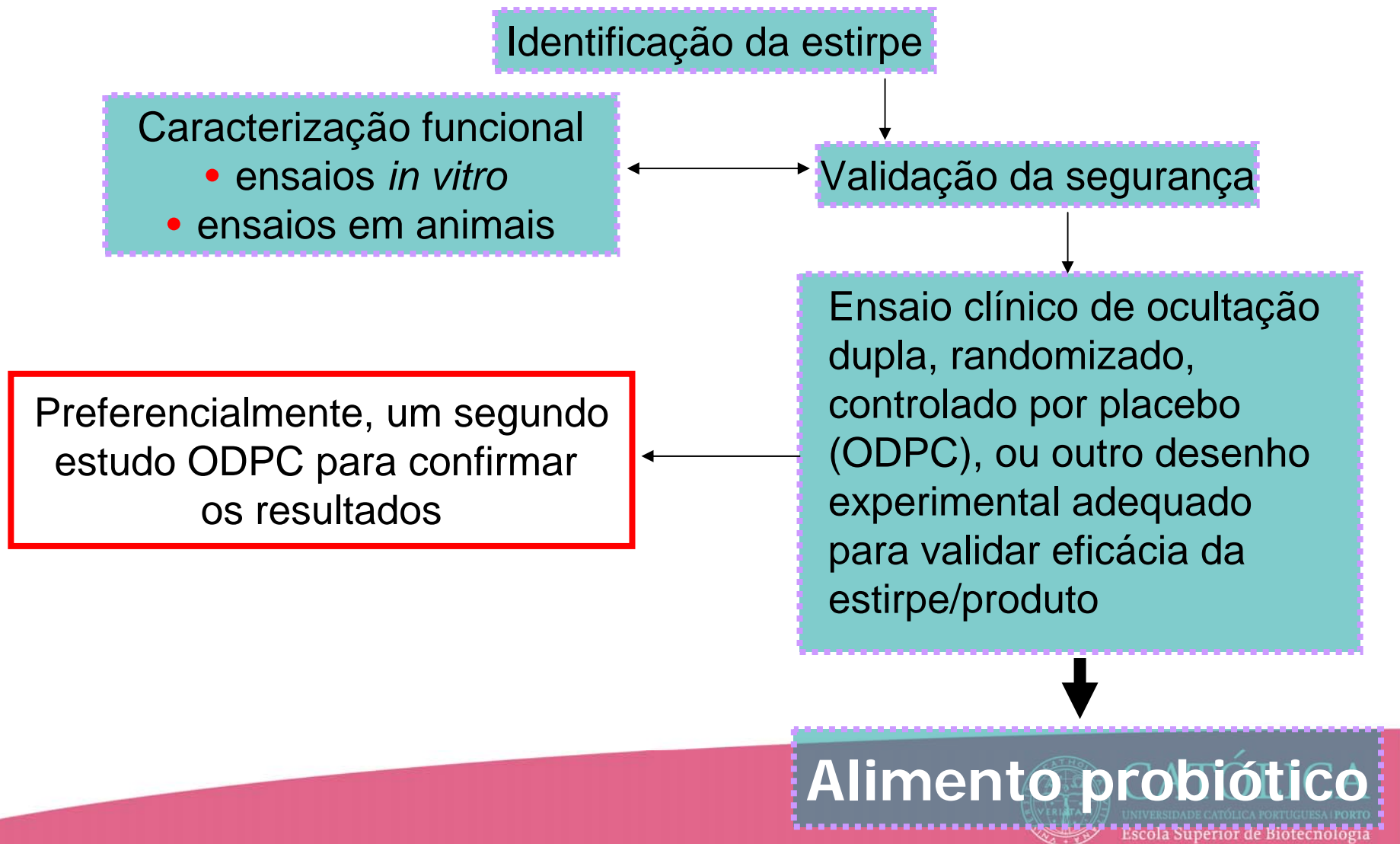
# Outros produtos probióticos, prebióticos ou simbióticos

- ❖ Queijo, kefir e fórmulas infantis
- ❖ Gelados
- ❖ Barras energéticas/cereais de pequeno almoço
- ❖ Suplementos dietéticos





# Desenvolvimento de alimentos pro-, pre- ou simbióticos



# Probióticos: identificação

Strain	Death rates (log cfu g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	
	GJ	GJ/BS
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC -1	-0.0017±0.0013	0.0642±0.0908
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Ki	-0.0010±0.0010	0.0514±0.0741
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LCS-1	<b>0.0293±0.0006</b>	<b>0.1873±0.0351</b>
<i>Bifido bacterium animalis</i> BLC-1	-0.0030±0.0010	<b>0.2221±0.0004</b>
<i>Bifidobacterium animalis</i> Bo	0.0009±0.0010	0.0061±0.0040
<i>Bifidobacterium animalis</i> Bb-12	0.0122±0.0019	0.0119±0.0004
<i>Lactobacillus brevis</i> LMG 6906	-0.0003±0.0027	0.0111±0.0050

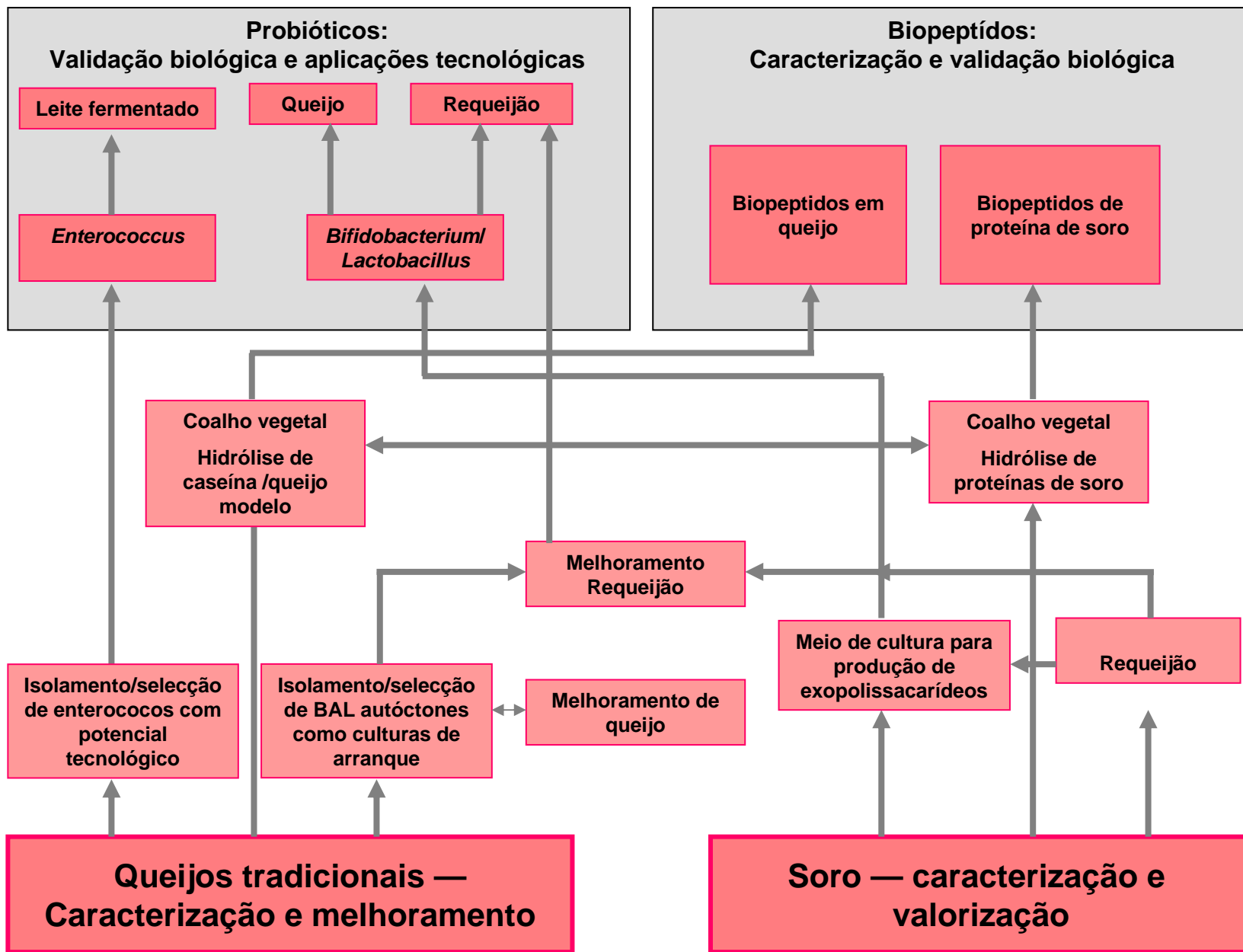


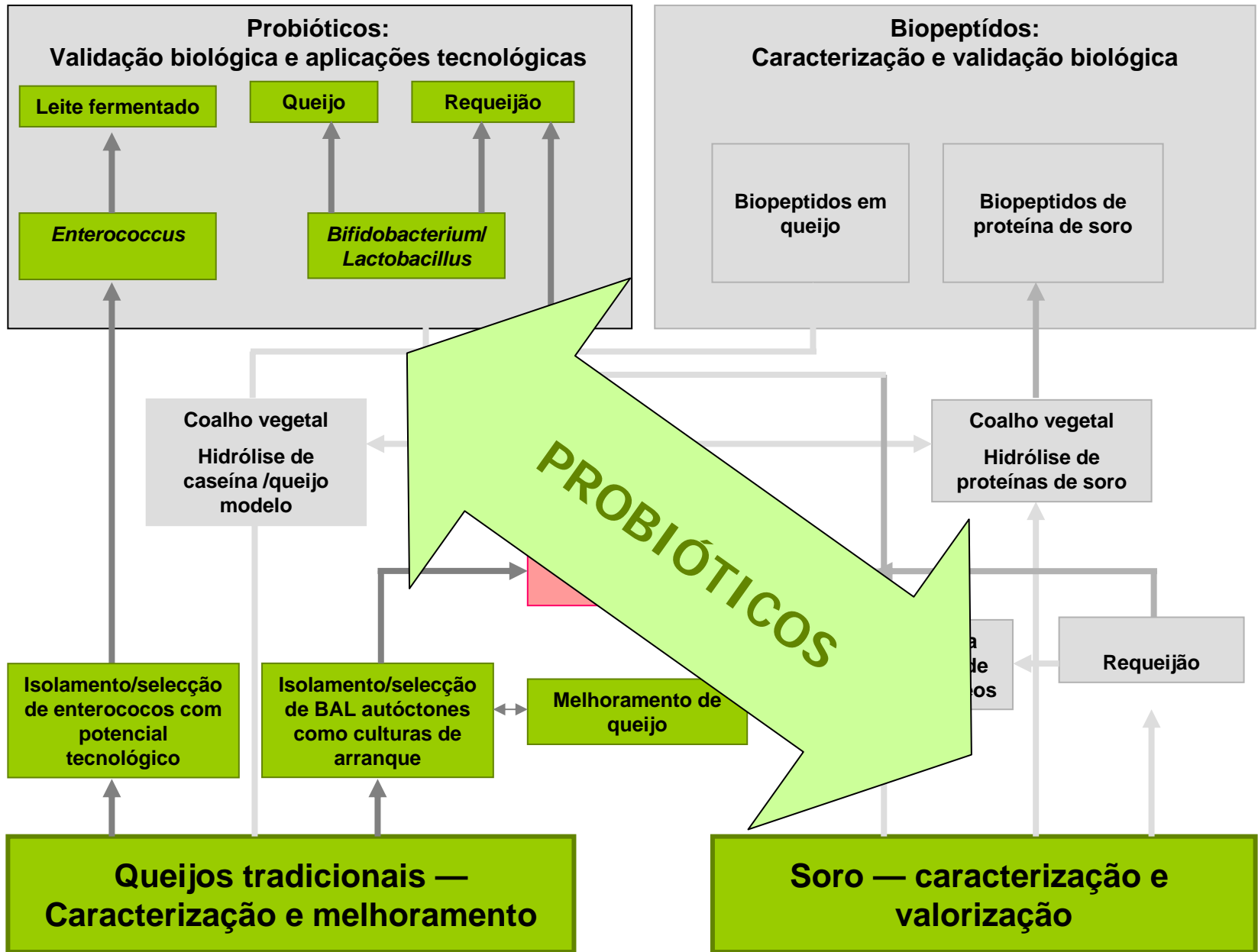
# Probióticos: validação de segurança

- ❑ **Determinação dos padrões de resistência aos antibióticos**
- ❑ **Avaliação de actividades metabólicas específicas (p.ex. produção de D-lactato e desconjugação de sais biliares)**
- ❑ **Avaliação de efeitos colaterais em ensaios em humanos**
- ❑ **Vigilância epidemiológica de incidentes adversos em consumidores (pós-venda)**
- ❑ **Avaliação do potencial de produção de toxinas , se estirpe pertencer a espécie produtora de toxinas**
- ❑ **Avaliação do potencial hemolítico, se estirpe pertencer a espécie hemolítica**









# Microrganismos probióticos: novos vectores alimentares

## VALORIZAÇÃO DO SORO POR ADIÇÃO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS



Madureira, A. R., Gião, M. S., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Freitas, A. C. & Malcata, F.X. (2005). *Journal of Food Science* 70(3): M160-M165.

Madureira, A. R., Pintado, M. E., Gomes, A. M. P., Freitas, A. C. & Malcata, F. X. (2006). Matrizes proeicas como veiculos para probióticos. *Anil Leite D+T* 1 (4), 8-10

Madureira, A. R., Soares, J. C., Gomes, A. M., Pintado, M. E. Freitas, A. C. & Malcata, F. X. (2008). *Dairy Science Technology* (aceite para publicação)



# Estirpes probióticas

- *Bifidobacterium animalis* Bo
- *Bifidobacterium animalis* BLC1
- *Lactobacillus acidophilus* Ki
- *Lactobacillus acidophilus* LAC1
- *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*
- *Lactobacillus brevis*
- Controlo (sem bactérias)

10% (v/v)



adição a matrizes proteicas de soro



homogeneização



distribuição por frascos estéreis



armazenamento a 7 °C, durante 21 d

amostragem



## Análise

- viabilidade
- controlo microflora contaminante
- perfil acidificação
- análises químicas

0, 3, 7, 14, 21 e 21 d

## • Matrizes:

- 80 % soro de vaca + 20 % leite de vaca
- 90 % soro de vaca + 10 % leite de ovelha
- 100 % soro de ovelha
- 90 % soro de ovelha + 10 % soro de ovelha
- 100 % mistura de soro (resultante de produção queijo com 90% leite de ovelha + 10 % leite de vaca)
- 90 % mistura de soro + 10 % leite de vaca
- 90 % mistura de soro + 10 % leite de ovelha



## • Aditivos:

### Matrizes salgadas

- 0.8% sal
- 0.8% sal + 0.35% xantano
- 0.8% sal + 0.05% alho + 0.05% ervas aromáticas

### Matrizes doces

- 5% açúcar
- 10% doce de morango
- 5% açúcar + 3% *Aloe vera*
- 5% açúcar + 4.7% chocolate + 4.5% fibra de chocolate

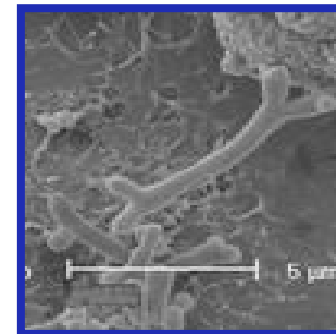
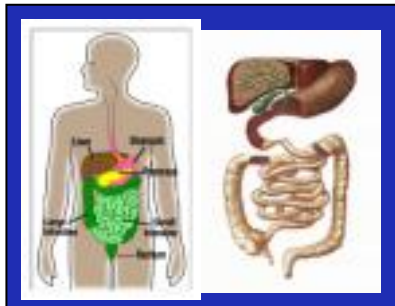


# Viabilidade com aditivos doces

- Perfil de viabilidade de *L. paracasei* semelhante em todas as matrizes => número de células mais elevado na matriz com chocolate => potencial efeito prebiótico da fibra de chocolate
- viabilidade de *L. paracasei* estatisticamente afectada por tempo de armazenagem e presença de aditivos

# Microrganismos probióticos: sobrevivência no tracto gastrointestinal

## ***PERFORMANCE DE PROBIÓTICOS SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS***

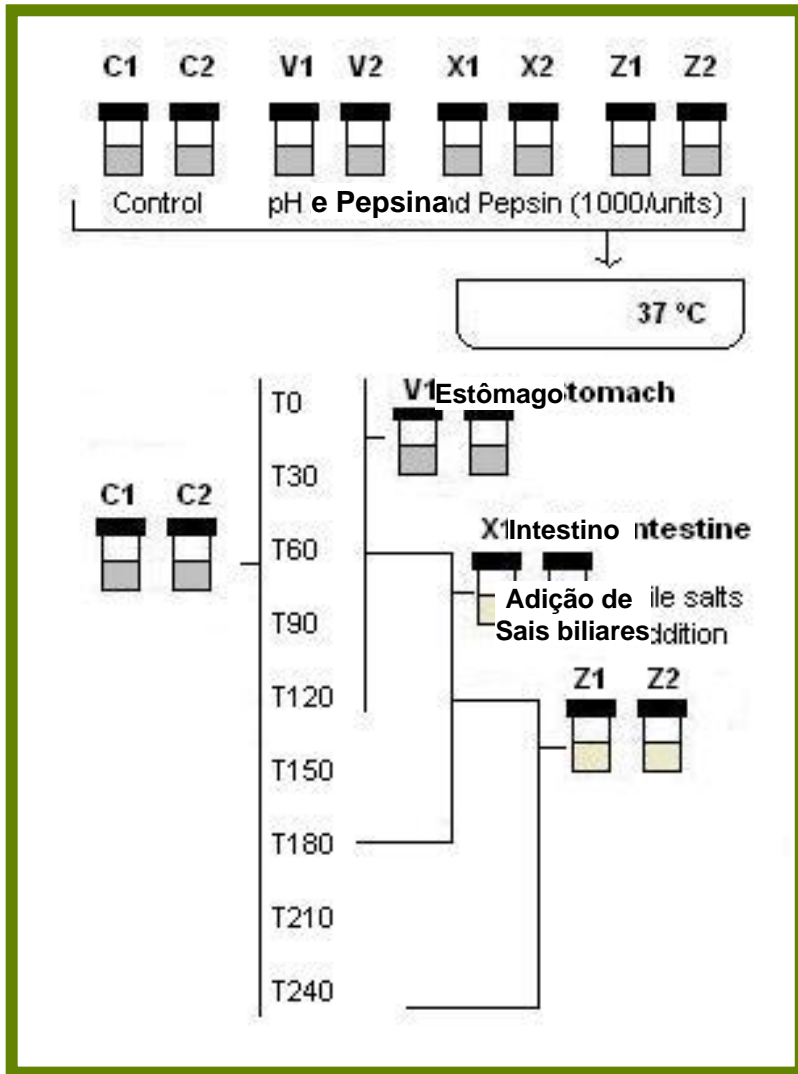


Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E. & Malcata, F. X. (2005). *International Dairy Journal* 15(6-9): 921-927.



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

# Simulação de condições do tracto gastrointestinal



## Estirpes probióticas

- *Bifidobacterium animalis* BLC-1
- *Lactobacillus acidophilus* LAC-1
- *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* LCS-1
- *B. animalis* Bo
- *L. acidophilus* Ki
- *L. brevis* LMG 6906
- *B. animalis* Bb-12

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E. & Malcata, F. X. (2005). *International Dairy Journal* 15(6-9): 921-927.



# Sobrevivência

## *Suco gástrico (simulado):*

- *L. paracasei ssp. paracasei* LCS-1: decréscimo de ca. de 2 log;

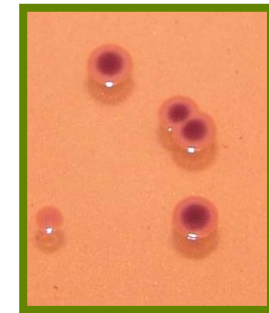
## *Suco gástrico + sais biliares simulados:*

- *L. brevis*, *B. animalis* Bo e *B. animalis* Bb-12: resistentes;
- *L. acidophilus* LAC-1 e *L. acidophilus* Ki: resistentes ao suco gástrico, mas não aos sais biliares;
- *B. animalis* BLC-1: sensível aos sais biliares



# Microrganismos probióticos: estirpes isoladas de produtos tradicionais

## PAPEL DE ENTEROCOCOS ISOLADOS DE QUEIJO TERRINCHO



Pimentel, L. L.; Semedo, T.; Pintado, M. M. E.; Tenreiro, R.; Crespo, M.T.B. & Malcata, F. X.  
*Journal of Food Protection* 70, 2161-2167.



# Triagem de enterococos

## Seleccção de estirpes

- Identificação
- Susceptibilidade a antibióticos (12 ab)
- Factores de virulência (10 genes)
- Resistência aos sais biliares e baixo pH
- Adesão a células Caco-2

73 isolados

## Propriedades tecnológicas

- Crescimento em meio de fermentação (GEM)
- Estabilidade em leite e iogurte

4 estirpes

## Sobrevivência no tracto gastrointestinal

- *E. faecium* 32
- *E. durans* 37
- 4 voluntários
- iogurte 5 d
- amostras fecais

2 estirpes



# Propriedades tecnológicas (cont.)

## Crescimento em fermentador



*E. faecium* 32

*E. durans* 37

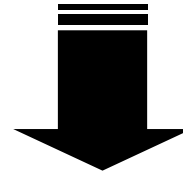
Meio (GEM)

Volume: 15 L

Temperatura: 37 °C

Tempo: 19 h

pH 5.8



# Propriedades tecnológicas (cont.)

## Suspensão e mistura com agentes crioprotectores

### Centrifugação

(4000 rpm, 15 min, 4 °C)

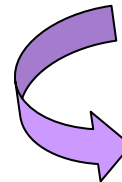


Solução crioprotectora:

10% leite magro

10% sucrose

Resuspensão de células  
em 0.01 M PBS (pH 7.2)

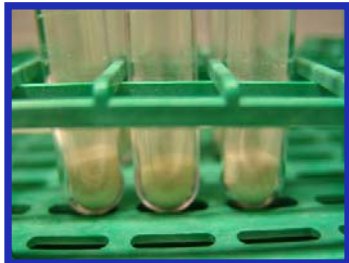
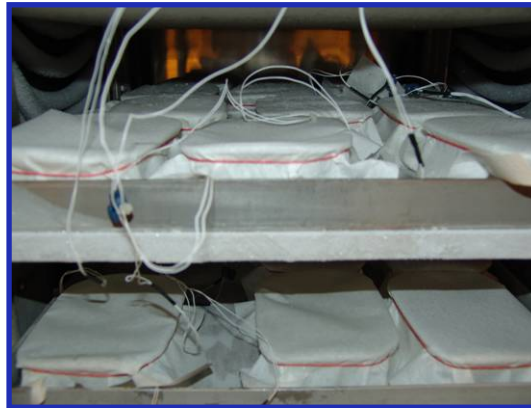


# Propriedades tecnológicas (cont.)

## Liofilização e armazenamento



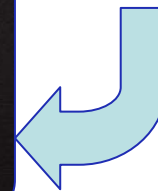
Liofilizador



**37 °C: 2 meses**

**4 °C: 6 meses**

**-20 °C: 1 ano**



# Sobrevivência no tracto gastrointestinal *in vivo*



Amostras fecais tratadas em câmara de anaerobiose

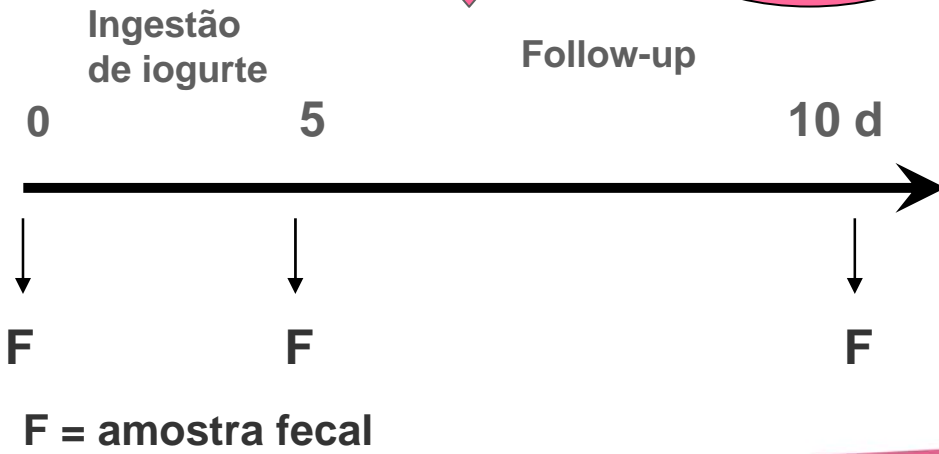


300 g/d  
( $10^7$  cfu/ml)

Cultura em meios selectivos



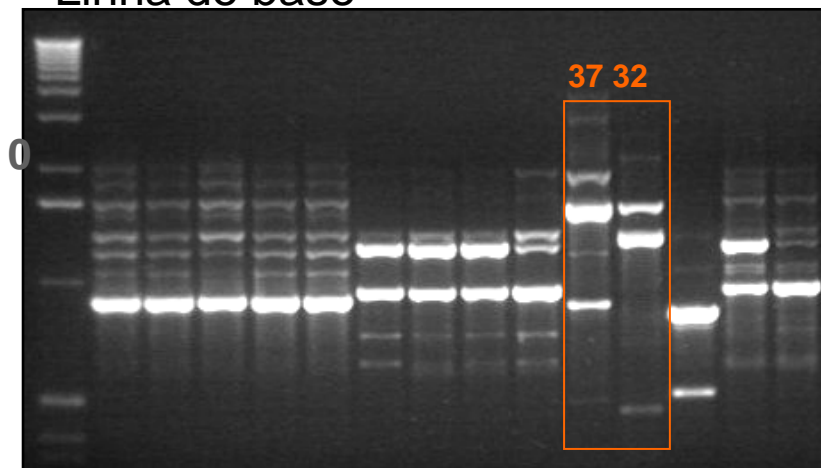
Deteccção com RAPD- PCR



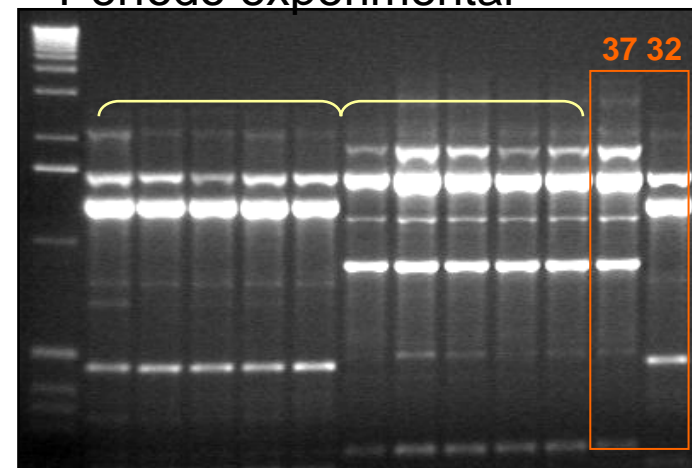
# Sobrevivência no tracto gastrointestinal *in vivo* (cont.)

- Nenhuma estirpe detectada nas fezes, antes do período de ingestão (linha de base)
- Ambas as estirpes detectadas durante período de ingestão, em todos os voluntários
- *E. faecium* 32 apresenta número de células viáveis 10 vezes superiores aos de *E. durans* 37

Linha de base



Período experimental



# Produtos pro- e prebióticos: potenciais alegações

- Bem-estar
- Melhoria/manutenção saúde intestinal
  - Colonização
  - Formação de substâncias antimicrobianas
- Contribuição para as defesas do organismo
  - Estimulação do sistema imunitário
  - Diminuição do colesterol no sangue
  - Área com pouca validação científica



# Produtos pre-, pro- e simbióticos: limitações

- Selecção rigorosa de estirpes em termos de viabilidade, colonização e adesão
- Numerosas preparações no mercado
- Poderão ser necessários vários meses de terapia antes da observação de efeitos
- Consumo regular obrigatório
- Concentração (dose) altamente variável



# Conclusões

- **Importância do estabelecimento de padrões de comunicação de função**
- **Importância dos prebióticos como factor bifidogénico, e papel complementar/potenciador do efeito probiótico**
- **Identificação de estirpes resistentes a factores ambientais e novos/melhorados veículos alimentares para assegurar a sobrevivência e viabilidade => fortalecer a sua importância na dieta alimentar**
- **Aplicação da genómica e proteómica para identificação mecanística da funcionalidade probiótica e prebiótica=> ciclo de inovação com desenvolvimento de novos alimentos funcionais (trinómio ciência, indústria, consumidor)**



**Muito obrigado !**

