

## APLICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS EN NUEVOS ALIMENTOS FUNCIONALES

Font de Valdez, G.<sup>1</sup>; Taranto, M. P.; Médici, M.; Molina, V.

### RESUMEN

El aporte de los alimentos funcionales (AF) o con componentes funcionales o bioactivos, tanto naturales como procesados, es una de las estrategias más prometedoras en el campo de la nutrición. En este contexto la aplicación de las BL en este tipo de alimentos constituye un importante segmento de la industria alimentaria ya que ejercen una gran influencia en el mantenimiento de la función intestinal. Asimismo, este grupo de microorganismos mejoran el estado inmunológico, actúan como barrera en la colonización por patógenos intestinales y diseminación bacteriana intestinal, intervienen en la metabolización de la lactosa, modulan los niveles lipídicos, suministran oligoelementos (vitaminas), entre otras funciones. La versatilidad de este grupo de bacterias incentiva la búsqueda constante de nuevas materias primas (soja, jugos, vegetales, harinas, cereales, etc) para la elaboración de productos alimenticios con nuevas y mejores características desde el aspecto nutricional, tecnológico y económico-social.

**PALABRAS CLAVE :** bacterias lácticas, alimentos funcionales, salud, biotecnología.

### SUMMARY

## APPLICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN NEW FUNCTIONAL FOODS

The contribution of Functional Foods (FF), natural or processed, is one of the most promising strategies in the field of the nutrition. In this context, the application of the lactic acid bacteria in the development of FF constitute an important segment of the food industry since they exert a great influence in the maintenance of the intestinal function. Moreover, this group of microorganisms improves the immunological state, acts like barrier in the colonization by intestinal pathogens and bacterial dissemination, participates on lactose metabolization, modulates the lipid profile, provides oligoelements (vitamins), among other functions. The versatility of this group of bacteria stimulates the continuous search of new raw materials (soybean, juice, vegetables, flours, cereals, etc) for the development of innovative products with enhanced characteristics from nutritional, technological, economic, and social aspect.

**KEY WORDS:** lactic acid bacteria, functional foods, health, biotechnology.

Los avances de la ciencia y medicina contribuyeron a incrementar la expectativa de vida, es decir, mantener el estado saludable y la funcionalidad psíquica de la persona aún en la ancianidad. Según el National Health Service (NHS) se destina un elevado presupuesto (superior a 15 billones de dólares) para prevenir enfermedades asociadas a los hábitos alimenticios. Sin embargo, a pesar de estas erogaciones, las experiencias indican que la dieta

continúa siendo el factor clave para el desarrollo de estrategias preventivas tendientes a mejorar la salud de los individuos y de una nación.

En los países en desarrollo, las condiciones económicas y sociales han llevado a cambios en los hábitos alimenticios los cuales determinan riesgos desde el punto de vista nutricional y/o de la salud. Ya lo afirmaba Hipócrates hace casi 2.500 años: *“deja que la alimentación sea tu*

<sup>1</sup>CERELA -Centro de Referencia para Lactobacilos- Chacabuco 145 (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina

*medicina y que la medicina sea tu alimentación*". De igual manera, la relación entre la dieta y salud fue reconocida por la medicina china hacia el año 1.000 A.C.

En los últimos años ha crecido el interés del consumidor por obtener dietas más beneficiosas para la salud, que sumado a la desconfianza hacia los alimentos "procesados" y la oferta en el mercado de productos "naturales", ha impulsado al desarrollo de **alimentos** denominados **funcionales** cuya ingesta influiría positivamente en una o más funciones del cuerpo, mejorando el estado de salud y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. Este tipo de alimentos son la nueva tendencia en el mercado y constituyen un segmento de impactante crecimiento en el ámbito de la industria alimenticia. La alimentación definida en las raciones diarias recomendadas puede contener, además de los nutrientes usuales, alimentos restaurados (restauración del contenido inicial de vitaminas y minerales) y alimentos enriquecidos. En este contexto, los **Alimentos Funcionales** (AF) van más allá de las necesidades básicas nutricionales y deben poder consumirse en cantidades compatibles con una alimentación normal, equilibrada y diversificada.

El avance de las biociencias se refleja en proyectos de Investigación y Desarrollo (I+D) dirigidos a mejorar la productividad y obtención de AF con efecto preventivo o terapéutico sobre una condición médica o nutricional adversa. En este contexto, los alimentos fermentados o suplementados con **Bacterias Lácticas** (BL) benéficas, consideradas microorganismos GRAS (Generally Recognised As Safe), desempeñan un papel protagónico en el diseño de AF novedosos ya que su empleo en la industria alimenticia está debidamente autorizado y reglamentado.

Numerosos trabajos demuestran los efectos beneficiosos de las BL usadas para el tratamiento y prevención de enfermedades. Dichas propiedades incluyen: efectos positivos en diarreas infantiles y otras infecciones intestinales por exclusión competitiva de microorganismos patógenos (Marteau & col., 2001), eliminación de los síntomas resultantes de la ingesta de leche en personas intolerantes a lactosa por la degradación de dicho carbohidrato (Fuller, 1989), reducción de los niveles de colesterol en individuos con hipercolesterolemia primaria (Taranto & col., 1998, 2000), estimulación del sistema inmunitario por su acción sobre las placas de Peyer en el intestino y aumento de la concentración de anticuerpos específicos (IgA) frente a agentes infecciosos (Medici & col., 2004, 2005), actividad antitumoral (Perdigón & col., 2001); acción anticarcinogénica ya que inhiben la transformación de compuestos procarcinogénicos a carcinogénicos (Gilliland, 1990; Huis in't Veld & col., 1996), entre otras.

Si bien el uso de BL ha sido asociado, principalmente, a la obtención de productos lácteos, también tienen una activa participación en procesos de panificación, elaboración de embutidos y bebidas, conservación de alimentos, entre otros. La versatilidad de este grupo de microorganismos incentiva la búsqueda constante de nuevas materias primas (sustratos) para la elaboración de productos alimenticios con nuevas y mejores características desde el aspecto nutricional, tecnológico y económico-social. En este aspecto, la soja, convenientemente procesada (extracto acuoso de soja), proporciona un soporte interesante por su bajo costo y su alto valor proteico.

La proteína de soja es una de las mayores fuentes de proteína vegetal para alimento humano. La calidad de una proteína se basa en parámetros tales como cantidad y biodisponibilidad de aminoácidos esenciales y digestibilidad de la misma. Con la excepción de cantidades limitantes de metionina y cisteína, la soja es una excelente fuente de proteína alimenticia ya que contiene suficientes cantidades de lisina, deficiente en las proteínas de cereales (Kellor). Así, esta legumbre es un buen recurso para complementar, en variedad y calidad, una dieta que será óptima desde un punto de vista nutricional. No obstante, la presencia de galactosacáridos (estaquiosa, rafinosa, verbascosa) puede inducir flatulencias, debido a la falta de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa ( $\alpha$ -gal) en el lumen intestinal. Estos inconvenientes podrían ser subsanados exitosamente empleando BL con actividad a-gal, responsable de la hidrólisis de oligosacáridos. En estudios previos realizados en nuestro, se demostró la capacidad de algunas cepas de BL crecidas en leche de soja (*Bifidobacterium longum* CRL 849), capaces de hidrolizar los galactosacáridos en carbohidratos digestibles (Garro & col., 1994). *L. fermentum* CRL236 y CRL251, *L. plantarum* CRL 948 y *L. reuteri* CRL 1098 presentaron mayor actividad hidrolítica sobre estaquiosa y rafinosa, la cual es específica de cepa y no de especie bacteriana (LeBlanc & col., 2004a y 2004b). Sin embargo, esta leguminosa no cubre los requerimientos diarios de vitaminas debido al bajo contenido de las mismas en el poroto. La deficiencia en vitaminas puede ocurrir por dietas vegetarianas estrictas, malnutrición o estados fisiológicos como embarazo o lactancia. Esta deficiencia puede conducir a desórdenes tanto físico como neurológicos muchas veces graves que pueden ser irreversibles. En particular, la carencia de vitamina B<sub>12</sub> puede desencadenar patologías de envergadura como anemias perniciosas, degeneración combinada sub-aguda de los nervios periféricos y la médula espinal, con síntomas neurológicos graves. El hombre no puede sintetizar esta vitamina por lo que debe incorporarla en forma exógena a través de la ingesta

alimenticia. A escala industrial, la síntesis de vitamina B<sub>12</sub> activa es producida por especies de *Pseudomonas*, *Propionibacterium* y *Salmonella*, bacterias que no poseen carácter GRAS y por lo tanto no pueden ser usadas como probióticas. La adición de lactobacilos grado alimentario productores de estos oligoelementos resulta una alternativa importante sin precedentes en el mercado alimenticio nacional e internacional. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio en colaboración con NIZO Food Research (Holanda), revelaron que *L. reuteri* CRL 1098 es capaz de sintetizar cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>). El extracto celular libre de células (ECLC) de este microorganismo, crecido previamente en un medio de cultivo libre de vitamina B<sub>12</sub>, complementó la auxotrofia para esta vitamina de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 indicando que *L. reuteri* CRL 1098 produce un compuesto tipo cobalamina. La actividad de la vitamina aislada y purificada se puso de manifiesto en ensayos biológicos usando *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (mutantes *metE*, *cbiB*) como cepa indicadora, obteniéndose resultados positivos. Ensayos de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y espectrometría de masa (MS) demostraron que el compuesto presente en el ECLC de *L. reuteri* CRL 1098 es metilcobalamina, una de las formas biológicamente activas de la vitamina B<sub>12</sub>. Se destaca que estos estudios constituyen la primera evidencia de síntesis de cobalamina biológicamente activa en BAL (Taranto & col., 2003). La posibilidad de desarrollar un alimento funcional en base soja, conteniendo BL con propiedades benéficas permitirá disponer de un producto altamente nutritivo y de bajo costo con impacto económico-social muy importante.

Un efecto probiótico importante, de posible aplicación en el área médico nutricional, es la capacidad que tienen algunas BL de reducir el colesterol sérico. Aún cuando el colesterol es imprescindible para la vida, su exceso es un factor de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis y otras enfermedades coronarias. Datos estadísticos recientes revelan que una disminución de colesterol en sangre reduce la incidencia de muerte por afecciones coronarias en poblaciones con dietas ricas en grasa. En Argentina, un 46% de las defunciones son consecuencia de enfermedades cardiovasculares, siendo los hombres más susceptibles que las mujeres; un 30-40% de la población padece de hipercolesterolemia. En la actualidad existen diversas drogas para el tratamiento de esta anomalía pero los efectos colaterales derivados de las mismas llevan a replantear su uso terapéutico. En los últimos años ha surgido la posibilidad de usar BL con efecto hipocolesterolémico como un tratamiento natural de hiperlipemias de origen alimenticio.

*L. reuteri* CRL 1098 es capaz de reducir los niveles de colesterol, capacidad demostrada en ensayos *in vitro* e

*in vivo*. En estos últimos, se usaron ratones Albino-Suizo como modelo experimental hipercolesterolémico (MHC), establecido en base a una dieta de elevado contenido graso para alterar los niveles lipídicos normales. La dosis efectiva mínima del probiótico que no produce efectos colaterales indeseables como translocación bacteriana (paseje de la microbiota intestinal a hígado y bazo) fue de 10<sup>4</sup> cél/día, siendo ésta la más baja informada en la literatura con efecto hipocolesterolémico en modelo animal. Se diseñaron los protocolos para la administración de *L. reuteri* en forma *terapéutica* o *preventiva*. En el primer caso se obtuvo una importante disminución del colesterol total (38%) y triglicéridos (35%) juntamente con un 20% de aumento de la razón HDL/LDL. Estos resultados son alentadores ya que actualmente ninguna droga halopática produce aumento de la lipoproteína de alta densidad (HDL). También se obtuvo una disminución significativa de colesterol (20%) y triglicéridos (22%) cuando el microorganismo se suministra en forma preventiva. Taranto & cols. (2000) pusieron en evidencia el efecto hipocolesterolémico de la cepa *L. reuteri* CRL 1098 en un modelo experimental animal. La administración preventiva de *L. reuteri* CRL 1098 (10<sup>4</sup> células/día/ratón) durante 7 días consecutivos y posterior ingesta con una dieta enriquecida en grasa por un período de 7 días, se observó un incremento en la relación HDL/LDL, con una disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos sérico (Taranto & col., 1998-2000).

Investigaciones más recientes indican que las BL, por acción de sus sistemas proteolíticos, pueden liberar péptidos con actividad biológica, los cuales se encuentran "en estado latente" dentro de moléculas grandes de proteínas. Se determinaron péptidos, a partir de la hidrólisis de las caseínas, con propiedad hipotensora, antimicrobiana, inmunomoduladora, hipoalérgica, sedante, anticariogénica, fijadora de calcio, entre otras (Minervini & col., 2003; Leblanc & col., 2003).

En estudios inmuno-microbiológicos realizados en nuestro laboratorio utilizando un modelo murino, demostramos que cepas de BL aisladas de diferentes nichos ecológicos (*L. acidophilus*, *B. adolescentis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. animalis* y *L. reuteri*): pertenecientes al Banco de Cepas Probióticas de CERELA, son capaces de inducir una inmunoestimulación a nivel de mucosa intestinal (intestino delgado y/o grueso) con producción de IgA cuando las mismas son administradas por vía oral durante períodos prolongados de tiempo. Se encontraron niveles de IgG normales en intestino y ausencia de translocación de la microflora entérica a sitios extra-intestinales indicando la ausencia de una respuesta inflamatoria local. Estos resultados demuestran que las BL potencialmente incluidas en un AF, no afectarían la integridad del epitelio ni el

balance microbiano intestinal así como tampoco su interacción con las células inmunes presentes en el tejido linfoide asociado a intestino, minimizando los efectos dañinos provocados por enterobacterias.

Nuestro grupo de trabajo se ha planteado un nuevo desafío: el diseño de un alimento o “golosina probiótica” que reúna las bondades de la soja y miel de caña -ambos productos con una gran incidencia en la economía de la región- y las propiedades benéficas (probióticas) de las BAL. Se trata de una barra de cereal a base de porotos tostados de soja, avena, maíz y arroz inflado, almíbar enriquecido con miel de caña de azúcar, adicionadas con BL seleccionadas por su capacidad de aumentar las defensas naturales del organismo. Las cepas han sido cuidadosamente seleccionadas en base a sus propiedades inmunomoduladoras y su resistencia a las condiciones extremas involucradas en la elaboración del producto.

Es importante resaltar que el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) es reconocido internacionalmente por sus investigaciones en el campo de las BL y sus efectos probióticos, siendo pionera en el desarrollo de productos tecnológicos, disponibles en el mercado nacional y latinoamericano. Asimismo, sus aportes al conocimiento de las BL en aspectos fisiológicos, metabólicos, moleculares y modo de acción de los probióticos, son reconocidos internacionalmente. Este conocimiento ha llevado al desarrollo de diversos proyectos, los cuales se concretaron en productos actualmente en el mercado como la Leche BIO® y BIOFLORA® y el Queso probiótico ILOLAY®.

La demanda del consumidor y las exigencias de la industria, ávida de nuevos productos funcionales para un mercado altamente competitivo, son posiblemente el motor principal de los estudios sobre las BL, no sólo desde el punto de vista probiótico sino también, en por sus cualidades tecnológicas, como la producción de exopolisacáridos (Vaningelgem & col., 2003), bacteriocinas (Saavedra & col., 2004) y propiedades sensoriales (Saarela & col., 2000).

## CONCLUSIÓN

El conocimiento cada vez mayor de la implicancia de los AF en la regulación de la expresión génica, de la proliferación y función celular, de la ecología intestinal, del sistema de antioxidación o del metabolismo en general, es una muestra de la trascendencia que estos alimentos tendrán en el futuro en los hábitos alimentarios de la población, tanto infantil, como adulta o anciana. Todo ello, sumado al conocimiento de la biotecnología y los efectos benéficos de las BL, permitirán el desarrollo de productos alimenticios

novedosos con nuevas y mejores características desde el aspecto nutricional, tecnológico y económico-social.

## AGRADECIMIENTOS

A CONICET, ANPCyT y CIUNT por los subsidios recibidos que permitieron solventar parcialmente las investigaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- FULLER, R. 1989. A review: Probiotics in man and animal. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.
- GARRO, M.; VALDEZ, G.F.; OLIVER, G. & GIORI, G.S. 1998. Behaviour of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* in Soy Milk. Z. Lebensm Unters Forsch A 206:72-75.
- GARRO, M.; GIORI, G.S.; VALDEZ, G.F. & OLIVER, G. 1994.  $\alpha$ -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*. Lett. App. Microbiol. 19: 16-19.
- GILLILAND, S.E. & WALKER, D.K. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73: 905-911.
- HUIS IN'T VELD, J.H.J. & SHORTT, C. 1996. Selection criteria for probiotic microorganism. Gut flora and health – Past, Present and Future. The Royal Society of Medicine Press Ltd. International Congress and Symposium Series. 219:27-36.
- LEBLANC, J.G.; GARRO, M.S. & SAVOY DE GIORI, G. 2004a. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal,  $\alpha$ -galactosidase activity and fermentation products. 65: 119-123.
- LEBLANC, J.G.; GARRO, M.S.; SAVOY DE GIORI, G. & FONT DE VALDEZ G. 2004b. A novel functional soy-based food fermented by lactic acid bacteria: Effect of heat treatment. J. Food Sci. 69: 246-250.
- LEBLANC, J.; FLISS, I. & MATAR, C. 2004. Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. Clin Diagn Lab Immunol. 11: 1171-1181.
- MARTEAU, P.R.; de VRESE, M.; CELLIER, C.J. & SCHREZENMEIR, J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am. J. Clin. Nutr. 73: 430S-436S.
- MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G. & PERDIGON, G. 2004. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. Int. Dairy J. 14: 611-618.

- MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; WEILL, R. & PERDIGON, G. 2005. Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *J. Dairy Sci.* 72: 243-249.
- MINERVINI, F.; ALGARON, F.; RIZZELLO, C.G.; FOX, P.F.; MONNET, V. & GOBBETTI, M. 2003. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5297-5305.
- PERDIGON, G.; LOCASCIO, M.; MEDICI, M.; P. DE RUIZ HOLGADO A. & OLIVER, G. 2003. Interaction of bifidobacteria with the gut and their influence in the immune system. *BIOCELL.* 27: 1-9.
- ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.; CARLOS, I., DE OLIVEIRA, M. & de VALDEZ, G.F. 2003. Effect of a new fermented soy milk product on serum lipid levels in normocholesterolemic adult men. *Arch Latinoam Nutr.* 53: 47-51.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÂTTÔ, J & SANDHOLM, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215.
- SAAVEDRA, L.; MINAHK, C.; RUIZ HOLGADO, A.P. & SESMA, F. 2004. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH<sub>2</sub>-terminal sequence. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2778-2781
- TARANTO, M.P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; RUIZ HOLGADO A.P. & VALDEZ, G. F. 1998. Evidence of Hypocholesterolemic Effect of *Lactobacillus reuteri* in Hypercholesterolemic Mice". *J. Dairy Sci.* 81: 2336-2340.
- TARANTO, M.P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; RUIZ HOLGADO A.P. & VALDEZ, G. F. 2000. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J. Dairy Sci.* 83: 401-403.
- TARANTO, M.P.; VERA, J.L.; HUGENHOLTZ, J. F.; de VALDEZ, G. & SESMA, F. 2003. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces Cobalamin. *J. Bacteriol.* 185: 5643-5647.
- VANINGELGEM, F.; ZAMFIR, M.; MOZZI, F.; ADRIANY, T.; VANCAMMEYT, M.; SWINGS J. & DE VUYST, L. 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *App. Environ. Microbiol.* 70: 900-912.