

## **4. Revisión bibliográfica**

### **4.1 Alimentos funcionales**

En los últimos años, ha aumentado considerablemente el interés de los responsables de la salud pública y de los consumidores por conocer la relación entre la dieta y la salud. Se ha demostrado que muchos alimentos tradicionales como las frutas, las verduras, el pescado y la leche contienen componentes que resultan beneficiosos para nuestro organismo.

En los años 80's, las autoridades sanitarias japonesas se dieron cuenta que para controlar los gastos hospitalarios, generados por la mayor esperanza de vida de la población anciana, había que garantizar también una mejor calidad de vida. Se introdujo un nuevo concepto de alimentos, que se desarrollaron específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades.

Los alimentos funcionales son aquéllos que pueden proporcionar un beneficio para la salud además de contribuir a la nutrición básica. Se consideran aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Entre los muchos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra dietética, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los

fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos (European Food Information Council, 2006).

Los alimentos funcionales pueden tomar diferentes formas. Algunos pueden ser alimentos funcionales con componentes bioactivos que ahora se pueden relacionar con resultados positivos a la salud. Algunos pueden estar fortificados o mejorados, específicamente creados para reducir riesgos de enfermedades para cierto grupo de personas.

Los consumidores pueden seleccionar de un amplio espectro alimentos que contengan componentes funcionales (soya, proteínas de arándano) o vía fortificación (alimentos fortificados con folatos). Los beneficios a la salud pueden resultar de un incremento en el consumo de sustancias que son parte de la dieta o añadiendo nuevas sustancias a la dieta (Institute of Food Technology, 2005).

Los alimentos funcionales son una parte importante del bienestar en el que se incluye, una dieta equilibrada y actividad física. Se debería de consumir una amplia variedad de estos alimentos que incluyan algunos de los siguientes componentes: carotenoides, fibra dietética, ácidos grasos, flavonoides, isotiocianatos, fenoles, estanoles, polioles, prebióticos, fitoestrógenos y proteína de soya (Internacional Food Information Council, 2004). La **Tabla 1** muestra algunos ejemplos de componentes funcionales usados.

**Tabla 1.** Ejemplo de componentes funcionales

<b>Clase/Componentes</b>	<b>Fuente</b>	<b>Beneficio potencial</b>
Carotenoides	Acelga, espinaca, maíz, huevos, cítricos	Neutraliza la acción de los radicales libres que pueden dañar las células, fortalece las defensas antioxidantes de las células
Fibra dietética	salvado de avena, avena enrollada, harina de avena	Puede reducir el riesgo de padecer enfermedades coronarias, puede contribuir al mantenimiento de la salud del tracto digestivo
Ácidos grasos poliinsaturados-Omega-3	Avellanas, linaza	Puede contribuir al mantenimiento de las funciones mentales y visuales
Flavonoides	Moras, cerezas y uvas rojas, té cacao, chocolate, manzanas, alimentos cítricos	Fortalece las defensas antioxidantes de las células, puede contribuir al mantenimiento de la función cerebral
Probióticos	Yogurt, otros productos lácteos y no lácteos	Puede mejorar la salud gastrointestinal, puede mejorar la absorción del calcio, puede mejorar la salud gastrointestinal y la inmunidad sistémica
Probióticos	Yogurt, otros productos lácteos y no lácteos	Puede mejorar la salud gastrointestinal, puede mejorar la absorción del calcio, puede mejorar la salud gastrointestinal y la inmunidad sistémica
Proteína de soya	Fríjol de soya y alimentos a base de soya	Pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares

## 4.2 Probióticos

El término probiótico que viene de la palabra griega que significa “para la vida” fue el primer término usado para describir sustancias producidas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otros microorganismos (Ouwehand et al., 1999 y Naidu et al., 1999). Fuller (1989) define un probiótico como “un suplemento alimenticio microbiano vivo que benéficamente afecta al animal huésped, mejorando su balance microbiano intestinal”. Esta definición ha evolucionado notablemente y hoy en día la definición más utilizada es la propuesta por la FAO en 2001: “Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped”.

Durante la década pasada, los productos probióticos se han vuelto cada vez mas populares, y su consumo se ha incrementado drásticamente en la mayoría de los países de Europa, Asia y América (Dave y Shah, 1997 (b)).

A pesar de las propiedades clínicas y de salud deseadas, los probióticos deben de cumplir con varios requerimientos para que puedan ser vendidos. Entre los requerimientos más importantes se encuentran: a) que la bacteria probiótica sobreviva en número suficiente en el producto, es por esto que un producto lácteo debe contener al menos  $10^6$  UFC/ml de bacterias probióticas al momento de su consumo (Blanchette et al., 1996) y deben de ser consumidas regularmente; el consumo debe ser mayor a 100 g/día (Dinakar y Mistry, 1994) b) que su estabilidad física y genética durante el procesado del producto esté garantizada, c) que todas sus propiedades esenciales para expresar sus beneficios a la salud después del consumo se mantengan durante la elaboración y el almacenamiento del producto, d) que no tenga efectos adversos en el sabor o aroma del producto y e) que no intensifiquen la acidez del producto durante su vida de anaquel del producto. A continuación, la **Tabla 2** muestra las características deseables de los microorganismos probióticos.

**Tabla 2.** Características deseables de microorganismos probióticos

- 
1. Origen humano
  2. Reconocidos como seguros
  3. Actividad metabólica estable
  4. No patógeno
  5. Perfiles de antibiograma (sensibilidad de la cepa a antibióticos)
  6. No inflamatorio
  7. Sobrevivencia en asociación con el sistema inmune adulto
  8. Inmunoestimulador para el sistema inmune con estimulación adecuada de citosina
  9. Propiedades antimutagénicas y anticancerígenos
  10. Vehículo potencial para proteínas recombinantes y péptidos en un sitio específico del tracto gastrointestinal
- 

Fuente: Collins et al., 1998.

Un mayor reto asociado con la aplicación de cultivos probióticos en el desarrollo de alimentos funcionales es la retención de su viabilidad durante el paso por el sistema gastrointestinal. Para que estos puedan ejercer sus efectos benéficos sobre el cuerpo del consumidor, los probióticos deben de poder tener la habilidad de crecer y proliferar en el intestino humano y por lo tanto deben de tener la capacidad no solo sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal, que involucra la exposición a ácido clorhídrico en el estómago y la bilis en el intestino delgado, sino también las condiciones durante el procesado de alimentos.

Los beneficios nutricionales y de salud adscritos a estas bacterias probióticas incluyen el alivio de la intolerancia a la lactosa (Nakasawa y Hosono, 1992; Salmine y Wright, 1998), inhibición de microorganismos patógenos, producción de vitaminas (Riordan y Fitzgerald, 1998), reducción de niveles de colesterol (Wood, 1992), efectos inhibitorios de tumores (Nighswonger et al., 1996), mejoramiento de la respuesta inmune (Marth y Steele, 1998), estabilización de la barrera mucosa y la prevención de diarrea (Kailasapathy y Rybka, 1997).

### **Alivio de la intolerancia a la lactosa**

Algunos individuos no digieren bien la lactosa debido a los bajos niveles de lactasa, lo que resulta en los síntomas de intolerancia a la lactosa. Estos individuos toleran más la lactosa del yogurt con cultivos vivos más que la leche debido a la lactasa y a los microorganismos contenidos en estos.

El yogurt con microorganismos retarda el vaciado gástrico y hace más lento el tránsito por el intestino, prolongando la acción de la lactasa en el intestino delgado y decrece la carga osmótica de la lactosa (Salminen y Wright, 1998).

### **Inhibición de microorganismos patógenos**

Los microorganismo probióticos también ayudan en la inhibición de microorganismos patógenos así como que benefician a la respuesta inmune reforzando la defensa inmune local a través de una respuesta específica de las IgA a los rotavirus y los microorganismos patógenos. Se ha demostrado que también modula la producción de diversas citoquinas que tienen su efecto en el sistema inmune (Riordan y Fitzgerald, 1998). También se ha comprobado que estas bacterias sintetizan péptidos antimicrobianos para inhibir bacterias gram(+) (Abee, 1995).

### **Reducción de niveles de colesterol**

No se conoce bien el mecanismo de las bacterias probióticas para la reducción del colesterol, pero se tienen algunas hipótesis. Una de estas hipótesis es que algunas especies de *Lactobacillus* asimilan el colesterol. Otra de estas hipótesis y la más aceptada es que especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* desdoblan enzimáticamente ácidos biliares, y siendo el colesterol un precursor de estos ácidos, los niveles de colesterol sérico disminuyen para convertirse en ácidos biliares y compensar la falta de estos (De Smet et al., 1994).

### **Efectos inhibitorios de tumores**

Algunos estudios sugieren que las bacterias probióticas contrarrestan efectos mutagénicos y genotóxicos en el colon y en otros sitios del cuerpo humano. Otros estudios sugieren que algunas bacterias probióticas o sus metabolitos influyen en la cinética celular epitelial en el colon, disminuyendo la proliferación de células cancerígenas (Nighswonger et al., 1996).

La característica clave de las bacterias saludables es su habilidad para antagonizar bacterias no deseables, mediante la competencia nutricional, producción de metabolitos tóxicos (peróxidos, ácido láctico), absorción de minerales, estímulo del sistema inmunológico, o la síntesis de bacteriocinas (Shah, 2001).

Mientras que en EUA, los fabricantes de probióticos y los investigadores de estudios de intolerancia a lactosa, diarrea y cáncer de colon en EUA, recomiendan valores de concentraciones mínimas que varían entre 1.0 millón hasta 100 millones de bacterias probióticas por gramo de producto para mostrar efectividad (Shortt y O'Brien, 2004).

### 4.3 Microflora intestinal

La microflora del tracto gastrointestinal humano se compone de una comunidad microbiana muy diversa que contiene microorganismos tanto anaerobios facultativos como anaerobios obligados (Naidu, et al., 1999) y es uno de las fuentes potenciales de microorganismos probióticos destinados para el uso humano. A través del tracto gastrointestinal, el número y los tipos de bacterias presentes exhiben una variación significativa desde el estomago hacia el colon (Kimura et al., 1997). Inicialmente las células bacterianas llegan al estómago lavadas de saliva de la cavidad oral y, solamente los microorganismos resistentes al ácido sobreviven (Naidu et al., 1999). Menos de  $10^3$  células por gramo de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus* mayoritariamente, son encontradas en el estómago (Parodi, 1999). Bacterias anaerobias y Gram negativas predominan en el ileo distal, alcanzando niveles de  $10^5$  y  $10^7$  células/ml de contenido (Mitsuoka, 1992). En el colon, el número bacterias alcanza niveles de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células/gramo de contenido visceral (Naidu et al., 1999). *Bacteroides fragilis* es la bacteria numéricamente predominante en el colon. Las otras especies predominantes incluyen *bifidobacteria*, *clostridia*, *peptococci*, *streptococci*, *eubacteria*, *lactobacilli*, *peptostreptococci*, *tuminicocci*, *enterococci*, coliformes, metanogénicas, bacterias sulfato reductoras y acetogénicas (Fooks et al., 1999). La influencia de las bacterias intestinales sobre la salud humana puede ser considerada dañina, benéfica o neutral. *Bifiobacterium* y *Lactobacillus* son especies benéficas que contribuyen a la digestión, la estimulación inmune y la inhibición de patógenos. *Bacteroides*, *Escherichia*, *Clostridium*, y *Proteus* son ejemplos de bacterias potencialmente dañinas encontradas en el tracto gastrointestinal. Estas bacterias son capaces de producir sustancias dañinas, incluyendo aminas, indol, sulfuro de hidrógeno y fenoles de componentes alimenticios (Ishibashi y Shimamura, 1993).

#### **4.4 Bacterias ácido-lácticas (BAL)**

A través de la historia, el hombre ha usado a las bacterias ácido lácticas, las cuales se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas para producir productos de leche fermentada, incluyendo yogurt, leiben, dahi, kefir, etc. Hoy en día son utilizadas para producir alimentos procesados, tales como productos de carne fermentada, pepinillos japoneses y pan (Andersson et al., 2001).

Este tipo de bacterias son los probióticos más utilizados, constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, así como en nuestro aparato digestivo. La acción de estas bacterias desencadena un proceso microbiano por el cual la lactosa (el azúcar de la leche) se transforma en ácido láctico. A medida que el ácido se acumula, la estructura de las proteínas de la leche va modificándose (van cuajando), y lo mismo ocurre con la textura del producto. Existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades particulares de los distintos productos resultantes (Boletín del Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación, 1999).

##### **4.4.1 *Lactobacillus***

El género *Lactobacillus* comprende bacterias gram-positivas, no esporuladas, no productoras de catalasa y anaeróbicas que comúnmente producen ácido láctico como su principal metabolito. *Lactobacillus* se aíslan generalmente de leche fermentada y del tracto intestinal del hombre y otros animales (Fox et al., 1993).

Para su energía requieren de carbohidratos y fuentes de carbono, también requieren aminoácidos, nucleótidos y vitaminas. Pueden ser exitosamente

cultivados en leche y alcanzar un número máximo después de 24 horas de incubación a 37 °C (Kandler y Weiss, 1989).

### **Lactobacillus casei**

Es un bacilo de tamaño promedio. En general el tamaño de las células bacterianas cambia con el tiempo.

Cada microorganismo está rodeado de una pared de aproximadamente 20 a 30 nm de grosor, la cual está compuesta de peptidoglicano, ácido teicoico y proteínas. Este recubrimiento puede no ser una estructura intrínseca como una cápsula, sino que puede ser una capa de productos metabólicos adheridos a la pared de la célula (Kunji, 1998). Los componentes celulares así como también las actividades biológicas pueden cambiar bajo diferentes concentraciones.

El medio más común para el cultivo de bacterias ácido-lácticas es el medio MRS y el medio Rogosa (De Man, 1960; Efthymiou y Hansen, 1962).

Es un organismo homofermentativo que genera energía a partir de la glucosa de acuerdo a la siguiente reacción:



El ácido láctico producido, se acumula en el medio, y el pH del medio decrece. Cuando la concentración de ácido láctico incrementa a 16 g/l, el pH decrece cerca de 4, el crecimiento microbiano cesa debido a la alta concentración de ácido. Cuando el pH del medio se ajusta constantemente a 7,0 con un agente alcalino como amoníaco o hidróxido de sodio, las células continúan creciendo.

Este microorganismo es importante debido a que ejerce sus beneficios sobre el cuerpo humano; específicamente algunos de sus efectos son:

- 1) Modificación de la función gastrointestinal
- 2) Actividad antitumoral
- 3) Protección de infecciones
- 4) Efectos antihipertensivos
- 5) Efectos inhibitorios sobre la producción de inmunoglobulina
- 6) Efectos en cáncer de vejiga (Matsuzaki, 2003).

Estudios recientes han incluido la investigación de los efectos benéficos de productos de leche fermentada, así como también del efecto de los constituyentes celulares y los productos metabólicos de las BAL usados en estos productos para la homeostasis del huésped. Los resultados obtenidos de estos estudios han demostrado que *L. casei* y los productos lácteos elaborados utilizando este microorganismo tiene muchas actividades biológicas (Matsuzaki, 2003)

Debido a esto, a esta cepa y a otras cepas benéficas más se les ha denominado con el término “probiótico”.

#### **4.5 Microencapsulación**

La microencapsulación puede ser considerada como una forma especial de empacar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de influencias deletéreas. En un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas. Dentro del término de microencapsulación, se incluyen las microcápsulas, las micropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas, aunque existe una terminología específica dependiendo de la industria de aplicación, por ejemplo la farmacéutica hace una distinción entre microcápsulas y microesferas dependiendo de cómo se encuentre distribuido el material encapsulado dentro de la partícula (Rao et al., 1989).

La microencapsulación es un proceso por medio del cual las células son empaquetadas con un material que las protege del ambiente desfavorable (Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

Dado que los probióticos son generalmente de origen intestinal, muchas cepas no pueden crecer en un medio con base láctea y son inactivadas cuando son expuestas a temperaturas altas, a los ácidos o al oxígeno durante el procesamiento de productos lácteos (Stanton et al., 2003). Debido a esta sensibilidad de las bacterias por el medio lácteo se han empleado formas para proteger a estas células en los alimentos, una de estas tecnologías es la microencapsulación. Esta tecnología soluciona problemas de proceso mediante la captura un ingrediente clave como núcleo central y recubrirlo con una capa de material inerte o protector (Vasishtha, 2003). Esta permite la protección de los ingredientes bioactivos y mejora su estabilidad durante el paso por el tracto gastrointestinal.

Existe una importante razón tecnológica por la cual son usados los productos lácteos como acarreadores de probióticos: muchos de estos productos han sido optimizados para la sobrevivencia de microorganismos fermentativos (Heller, 2001).

Algunos estudios se han realizado en base a la microencapsulación usando gelatina o gomas vegetales para dar protección a las bacterias que son sensitivas a valores bajos de pH. La microencapsulación por alginato es simple y de bajo costo, además, no es tóxico y por lo tanto puede usarse de manera segura en alimentos (Rao et al., 1989).

Para preparar las microcápsulas hay numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes (Magdassi y Vinetsky, 1996; Brazel, 1999). No obstante algunos autores clasifican a los métodos de encapsulación en físicos y químicos.

Como métodos químicos pueden citarse: Coacervación compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y encapsulación en liposomas (Thies, 1996; Gibbs et al., 1999).

Entre los métodos físicos se encuentran: El secado por aspersión y la encapsulación por lecho fluidificado como los más comunes (Shahidi y Han, 1993; Magdassi y Vinetsky, 1996; Thies, 1996; Gibbs et al., 1999).

A continuación se mencionarán algunos materiales que se utilizan en el proceso de microencapsulación

### **Gelatina**

La gelatina es la proteína más usada para la encapsulación de ingredientes alimenticios (Shahidi y Han, 1993); esto es debido a que es un material barato, disponible comercialmente y no tóxico.

Es un polipéptido de alto peso molecular derivado del colágeno, el cual se encuentra como componente principal de piel y tejido conectivo de animales. Se puede dividir en dos tipos de acuerdo al pre-tratamiento utilizado para su obtención; el tipo A se obtiene por un tratamiento ácido (utilizado para piel de cerdo) y el tipo B se obtiene por un tratamiento básico (utilizado para la piel de la res (Poppe, 1997). Los aminoácidos que se encuentran en la estructura de gelatina son todos a excepción del triptófano y la cisteína (Hudson, 1993). Una secuencia típica en su estructura es glicina-prolina-hidroxiprolina.

Este polipéptido se hincha cuando se coloca en agua fría, pero al calentarse, esta forma se disuelve y se forma un gel al enfriarse. El mecanismo de gelatinización es el de reversión al azar de la hélice cuando se enfría. Esta propiedad de formar un gel es la razón por la cual se utiliza en la industria de los alimentos (Poppe, 1997).

## **Alginato**

Se encuentra en las paredes celulares y en el espacio intercellular de algas marrones como *Laminaria hyperborea*, que prolifera en las costas de Noruega, donde incluso se recoge en forma mecanizada en aguas poco profundas, *Laminaria digitata*, presente en el Cantábrico, *Laminaria japonica*, que se cultiva en China y Japón, *Macrocystis pyrifera*, de aguas del Pacífico, y algunas especies de los géneros *Lessonia*, *Ecklonia*, *Durvillaea* y *Ascophyllum*. Todas estas algas contienen entre el 20% y el 30% de alginato sobre su peso seco.

Para que el producto se vuelva soluble en agua y estable, el ácido algínico, principal producto intermedio en la elaboración comercial, se transforma en alginatos comerciales añadiéndoles diferentes sales, lo que da origen al alginato de sodio (Onsoyen, 1992). La forma ácida es la menos estable, y la sal sódica la más estable. En disolución, es estable entre pH 5,5 y pH 10 (Calvo, 2003; Sheu y Marshall, 1993).

Su estructura incluye a los ácidos D-manurónico y L-glucorónico, los cuales se arreglan en regiones compuestas por solo uno de ellos llamadas bloques M y bloques G, y unas pocas regiones que se componen de estos dos bloques (Dziezak, 1991). La relación entre estos dos ácidos confieren diferentes grados de fuerza de gel y otras propiedades importantes.

Este compuesto se utiliza como formador de gel, estabilizante y formador de películas (Onsoyen, 1992). Los geles de alginato se forman por la evaporación de una solución de alginato seguida de un enlace iónico con una sal de calcio. Son impermeables a las grasas y aceites pero son barreras débiles para el agua. Sin embargo, sus geles son buenas barreras contra el oxígeno, retardan la oxidación lipídica y puede mejorar el sabor, la textura y la adhesión (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997).

Estos geles se han usado también en la encapsulación de ingredientes alimenticios altos en grasas (Veliky y Kalab, 1990), en la microencapsulación de células bacterianas (Sheu y Marshall, 1991)

### **Carragenina**

Es un polisacárido encontrado en los huecos en la estructura celulósica de las algas roja de la familia *Rhodophyceae*. Son polímeros lineales de cerca de 25000 derivados de galactosa con estructuras regulares pero imprecisas, estas dependen de su fuente y de las condiciones de extracción (Falshaw et al., 2001).

Es un polisacárido lineal formado por unidades de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa tanto sulfatada como no sulfatada. Según los tipos de arreglos se puede clasificar en: kappa, iota y lambda (Thomas, 1997). Estos tipos varían según su fuerza de gel, textura, solubilidad, sinergismo y temperatura de fusión. Todos estos tipos son solubles en agua caliente y solo las sales de sodio de las variedades iota y kappa son solubles en agua fría. Cationes como calcio y potasio son importantes para su gelatinización la cual es una reacción reversible cuando se calienta a 40-70°C (Thomas, 1997).

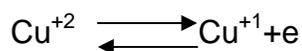
Uno de sus principales usos es como recubrimiento para antimicrobianos, dichos recubrimientos reducen la pérdida de agua, protección contra la oxidación y la desintegración (Krochta y DeMulder-Johnston, 1997). También se utiliza para encapsular bacterias (Hammil y Crawford, 1997)

Los geles de k-carragenina son suavizados (y generalmente es debido a que están sinérgicamente forzados) como goma "locust". I-carragenina tiene enlaces menos específicos pero una fuerza iónica incrementada, permite a los hélices formar zonas de empalme en geles suaves elásticos con una buena estabilidad de congelamiento-descongelamiento.  $\lambda$ - carragenina no es gelatinizada ya que la falta de enlaces  $^1C_4$  3,6-anhidro, permite a los residuos de galactosa revertir su conformación  $^4C_1$  la cual no permite la formación inicial de doble hélice requerida para la gelificación. Adicionalmente, la alta densidad de los

grupos sulfato promueven una conformación extensiva. Actúa como un crioprotector y mejora el comportamiento congelamiento-descongelamiento de la goma "locust" (Mangione et al., 2003).

#### 4.6 Potencial redox

El potencial redox se puede definir como aquel en el que el sustrato pierde o gana electrones con mayor facilidad. Cuando un elemento o compuesto pierde electrones, se dice que el sustrato ha sido oxidado, mientras que un sustrato que gana electrones se ha reducido, esto puede ser explicado mejor mediante la siguiente reacción:



También se puede obtener oxidación por adición de oxígeno, como se indica en la siguiente reacción:



Una sustancia que cede fácilmente electrones es un buen agente reductor, mientras que otra que capte electrones es un buen oxidante. Cuando se produce una transferencia de electrones de un compuesto a otro, se crea una diferencia de potencial entre ambos. Esta diferencia se puede medir con un instrumento adecuado y se expresa en milivoltios (mv). Cuanto más oxidada este una sustancia más positivo será su potencial eléctrico y cuanto más reducida más negativo será dicho potencial. El potencial redox se expresa con el símbolo Eh. Con respecto a las necesidades de Eh de los microorganismos, ciertas bacterias precisan condiciones de reducción para iniciar su desarrollo, mientras que otras precisan un Eh positivo.

Algunas bacterias aerobias se cultivan mejor en condiciones ligeramente reductoras, denominándose las microaerófilas.

Con respecto al Eh de los alimentos, los vegetales, especialmente los jugos, presentan valores de Eh de +300 a +400, la mayoría de las veces las bacterias y mohos aerobios son causa de la alteración de productos de esta clase. Se ha señalado en quesos de diversas clases, valores de Eh en la zona negativa, de -20 a -200 mv aproximadamente (Jay, 1978).

Este es otro factor determinante del crecimiento y del metabolismo del cultivo. El potencial redox del medio de cultivo nos indica su capacidad para aceptar o donar electrones, esto es: sus características oxidantes o reductoras. Uno de los factores que intervienen en el potencial redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno [O<sub>2</sub>].

Hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores. El metabolismo de ambos tipos de microorganismos presenta diferencias notables. El requerimiento de condiciones oxidantes o reductoras no debe confundirse con la necesidad de presencia o ausencia de oxígeno para que se produzca el crecimiento.

En general, cuando un microorganismo requiere un ambiente oxidante se dice que desarrolla un metabolismo oxidativo (o respirativo) mientras que los microorganismos que requieren ambientes reductores (o menos oxidantes) realizan un metabolismo fermentativo.

Un microorganismo es aerobio cuando necesita oxígeno para vivir y es anaerobio cuando o bien no lo necesita (anaerobios facultativos como las bacterias entéricas, o como *Saccharomyces cerevisiae*; o anaerobios aerotolerantes como las bacterias lácticas) o cuando muere en presencia de oxígeno (anaerobios estrictos como los clostridios).

Hay microorganismos que viven en ambientes carentes de oxígeno (anaerobios) que, sin embargo, llevan a cabo un metabolismo oxidativo porque usan otro aceptor final de electrones que actúa como oxidante ambiental. Por ejemplo, las bacterias que "respiran" nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) u otros compuestos orgánicos oxidados.

Hay microorganismos que, aunque viven en presencia de oxígeno, no son capaces de utilizarlo como aceptor final de electrones y deben desarrollar un metabolismo fermentativo (las bacterias lácticas, por ejemplo).

Por otra parte, hay microorganismos que pueden desarrollar ambos tipos de metabolismo. Esto es: en presencia de oxígeno desarrollan un metabolismo oxidativo y en su ausencia, fermentativo. El rendimiento de los procesos fermentativos es menor que el de los respirativos: las bacterias y las levaduras producen menos biomasa cuando crecen fermentando que cuando lo hacen respirando (Anónimo, s/a(b)).

Este parámetro ha sido estudiado en forma intensiva en los últimos años para conocer la naturaleza de dos fenómenos intrigantes: 1) magnitudes positivas del Eh, como consecuencia del oxígeno disuelto en el medio, inhiben el desarrollo de la mayoría de las bacterias anaerobias, 2) valores positivos similares del Eh, logrados por la adición de otras sustancias químicas al medio, pueden no afectar el desarrollo microbiano (Breznak y Costilow, 1994). También, diferentes efectos de la concentración de oxígeno y potencial redox en el crecimiento y supervivencia de *Escherichia coli*, sugieren que ésta es afectada por el potencial redox en forma independiente, tanto de la naturaleza del oxidante empleado, como de la concentración del oxígeno disuelto en el medio (George et al., 1998; George y Peck, 1998). Para explicar los efectos del Eh se supone que alguna molécula redox interactúa en la cadena de transferencia de electrones, alterando el transporte y la fuerza protón motriz (Bespalov et al., 1996). En otros microorganismos, al mantener el cultivo en ciertos valores del potencial redox, se

logra bloquear la transferencia de O<sub>2</sub> desde la fase gas a la líquida (Diaz et al., 2000).

#### **4.6.1 Efecto del ácido ascórbico y la cisteína sobre el potencial redox**

El contenido de oxígeno y el potencial redox han mostrado ser factores importantes para la viabilidad de BAL durante el almacenamiento de las leches fermentada (Brunner et al., 1993 a, b). El ácido ascórbico puede actuar como neutralizante de oxígeno y es permitido su uso en jugos de frutas y otros productos como aditivo. Además, la leche y los productos lácteos suministra solo 10-15% de los requerimientos diarios de vitamina C (Rasic y Kurman, 1978). Cuando se reduce el potencial redox así como el pH, se tiende a incrementar el crecimiento de bacterias ácido lácticas como *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Dave y Shah (1997c) reportaron que al adicionar vitamina C, como agente neutralizante de oxígeno, en un producto lácteo fermentado (yogurt) se obtenía una mejora en la viabilidad de *L. acidophilus*. En estos estudios, un decremento dramático en el número de bifidobacterias en el mismo cultivo iniciador fue observado y el uso de vitamina C o de un inóculo más grande no mejoró la viabilidad de las bifidobacterias (Dave y Shah, 1997b).

Por otra parte, ya que la cisteína es un aminoácido que contiene sulfuro, puede suministrar nitrógeno amino como un factor de crecimiento mientras que este mismo reduce el potencial redox; siendo estos dos factores que favorecen el crecimiento de especies de bifidobacterias anaerobias (Dave y Shah, 1997a).

#### **4.7 Queso**

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 para las especificaciones sanitarias de los quesos frescos y madurados, un queso se define como: "Producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas

apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado”.

Así mismo y en base a la misma norma, un queso fresco se define como: “Producto de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración”.

El queso es uno de los productos más importantes en la industria de los lácteos. La producción mundial de queso incrementó aproximadamente 10% de 1992 a 1999 llegando a una producción total de  $15.4 \times 10^6$  toneladas en ese mismo año.

Alrededor del 50% de la producción total de queso son de los tipos duros/semi duros, seguido del queso fresco, el cual llega a ser un 30% del total de queso producido (Heller et al., 2003).

Hoy es bien sabido que el queso es reconocido por su alto valor nutricional debido a sus altas concentraciones de proteína, calcio, riboflavina y vitaminas A y D (Dillon y Berthier, 2000).

La elaboración de queso generalmente involucra la concentración de grasa y caseína de la leche por la coagulación enzimática (renina) de la caseína o por pH ácido. La leche de vaca es ampliamente utilizada para la elaboración de quesos, pero en los países mediterráneos, la leche de cabras y ovejas, es utilizada para la manufactura de queso en un mayor rango (Johnson y Law, 1999).

La clasificación de los quesos incluye una indicación del proceso usado para la manufactura (Johnson y Law, 1999). A parte del contenido de humedad, el

tipo de maduración también es empleado para su clasificación. De acuerdo al contenido de humedad se pueden clasificar en: quesos duros (20-45% de humedad), semi duros/semi suaves (45-55% de humedad), y quesos suaves (>55% de humedad). Estos tres tipos de queso son consumidos después de un periodo de maduración en contraste con los quesos frescos (>70% de humedad), el cual es consumido después del drenado (Heller et al., 2003).

En cuanto al tipo de maduración, los quesos se clasifican en: no madurados, madurados internamente por bacterias, madurados internamente por hongos, madurados externamente por hongos y madurados externa e internamente por hongos.

En la elaboración de los diferentes tipos de quesos, existen diferentes pasos a seguir y son:

1. Preparación de la leche. La leche es la materia prima utilizada en la elaboración del queso, esta debe ser de un tipo definido (de vaca, cabra u oveja), así como también se debe de contar con cierta composición de esta para la elaboración de los distintos tipos de queso (por ejemplo; sólidos totales, grasas y proteínas). Será sometida a un tratamiento térmico o pasteurización para la destrucción de los patógenos y de los microorganismos no deseados. Muchas veces en esta etapa se realiza la estandarización de la leche con respecto a la proporción grasa/caseína.

2. Adición de cultivos iniciadores. Una vez que la leche ha sido pasteurizada, se cuenta con un producto microbiológicamente seguro pero también muy susceptible a la contaminación. Para evitar esto, se seleccionan ciertos cultivos como bacterias ácido lácticas que, como su nombre lo indica producen ácido láctico además de otros productos responsables de los sabores y aromas de ciertos quesos, los cuales provienen de la fermentación de la lactosa y del ácido cítrico proveniente de la leche.

3. Coagulación. Se realiza por medio de renina, bacterias ácido lácticas o enzimas como las proteasas presentes en sistemas gástricos de

mamíferos. Éstas actúan sobre la caseína en presencia de sales de calcio, convirtiéndola en paracaseína que precipita formando el coágulo.

4. Corte de cuajada y desuerado. El tiempo y las características de la cuajada dependen en gran medida del pH, el calcio contenido, la sustancia utilizada para la coagulación y la temperatura. El corte de la cuajada debe ser lento y cuidadoso para que la cuajada no pierda sus propiedades y no se deshaga. Después se agita suavemente y se deja asentar para que la mayor cantidad de suero salga de la cuajada y así obtener una masa de humedad uniforme.

5. Salado. con esta acción se inhibe el crecimiento de organismos formadores de ácido y por lo tanto se mejora la fermentación, ayuda a la sinéresis o el desuerado por la capacidad de la sal de atrapar la humedad y además le da sabor al producto final.

6. Moldeado y prensado. La cuajada es vertida en un molde para que adquiera una forma determinada, los moldes pueden ser plástico, metal o madera. El prensado de la cuajada es indispensable para la forma y textura adecuada del queso, así como también para ayudar a la remoción del suero.

7. Almacenado. La temperatura, el tiempo y las condiciones de almacenamiento depende del tipo de queso que se elaboró (Scott, 1998).

Una parte muy importante en la elaboración del queso es la adición del agente coagulante o, el más comúnmente utilizado, el cuajo. El cuajo es una enzima específica llamada quimosina o renina utilizada en la fabricación de queso cuya función es separar el agua de la leche, llamado suero, de la cuajada, a partir de la cual se fabrican los quesos. El cuajo es conocido desde tiempos muy antiguos, pero su componente activo y puro, la quimosina, sólo se conoce desde hace unas cuantas decenas de años. Se obtenía del estómago de terneros lactantes. Se sumergía una parte del estómago en cuestión en salmuera, y tras dejarlo reposar hasta que la quimosina difundiera a la salmuera, se utilizaba parte de ese líquido en la leche a cuajar. El inconveniente de este método antiguo radica

en la dificultad para obtener dosis precisas de cuajo, y en su variabilidad de concentración a lo largo de su tiempo de uso. El cuajo químico, la quimosina pura, no tiene este inconveniente, por lo que es más fácil estandarizar los tiempos de cuajado. En cuanto al cuajo puro, existen cuajos naturales: quimosina extraída químicamente del estómago de los terneros, y cuajo sintético, descubierto hace una decena de años: es quimosina obtenida a partir de procedimientos de síntesis química sin usar el estómago de terneros como materia prima.

El accionar de la quimosina es bien conocido por las ciencias de la leche. Actúa directamente en un punto delimitado de la caseína (una de las proteínas mayoritarias de la leche). Al romper dicha molécula se inicia la formación de un gel que atrapa la mayoría de los componentes sólidos de la leche; este gel se contrae poco a poco ayudado por la acidificación previa de la leche por medio de bacterias acidolácticas, y al contraerse va expulsando suero. Al cortar el gel en cubitos, se logra separar entre un 50 y un 90% del contenido inicial del agua de la leche. (Anónimo, s/a (a))

#### ***4.7.1 Queso como acarreador de microorganismos probióticos***

Para la explotación de las propiedades funcionales de las bacterias probióticas, el proceso de manufactura de los productos de queso deberán de ser modificados o adaptados a los requerimientos de los probióticos. Cuando esto no es posible se deberá de crear un producto nuevo o adicionar otro tipo de probióticos.

Las características más importantes que deben de cumplir las bacterias probióticas cuando son usadas en productos comerciales son: a) deben de estar presentes en número suficiente en el momento de su consumo, b) sus propiedades esenciales que expresan los beneficios a la salud deben de mantenerse y c) no deben de presentar efectos adversos en el sabor y aroma de la producto.

La intensidad de la interacción depende del momento en el cual los probióticos son añadidos al producto, y si se encuentran presentes o ausentes durante la fermentación. Si se añaden después de la fermentación, las interacciones permanecerán al mínimo (Fox et al., 1996). Si los probióticos se añaden al queso antes de la fermentación, el estado fisiológico de los probióticos puede ser de mucha importancia para la sobrevivencia durante la maduración y/o almacenamiento (Kolter et al., 1993; Hartke et al., 1994).

La mayor parte del trabajo en la producción de queso ha sido llevada a cabo con cultivos de *Bifidobacteria* solamente, o cultivos mezclados con *Bifidobacteria* y *L. acidophilus*, pero raramente *L. casei* ha sido usado (Stanton et al., 1998; Gobetti et al., 1998).

La incorporación de estos microorganismos en el queso parece ser una buena alternativa para mejorar la sobrevivencia del microorganismo ya que posee ciertas características que los ayudan a mantenerse viables por más tiempo, entre estas características están los altos valores de pH, la matriz cerrada, el alto contenido de grasa (puede ser utilizada para la protección de estos microorganismos durante el paso a través del tracto gastrointestinal.)

El queso fresco parece ser ideal para servir como acarreador de bacterias probióticas. Esto es debido a que no es necesario un periodo de maduración durante su elaboración.

Este tipo de queso presenta dos opciones para la adición de probióticos:

- a) Junto con el cultivo iniciador
- b) Junto con la sal.

Si se adiciona junto con el cultivo iniciador pueden presentarse dos problemas:

- a) El número de bacterias probióticas en el producto final puede ser difícil de controlar ya que un número considerable de células bacterianas se pierden durante el drenado de suero.
- b) La sobrevivencia de bacterias probióticas en el producto se puede ver afectada negativamente por la alta temperatura de escaldado (arriba de 55°C).

Por esto, la adición de probióticos junto con la sal es una alternativa deseable. Esto tiene como ventajas que el número de probióticos añadidos puede ser controlado con exactitud, los efectos negativos del escaldado se evitan y después de la adición y el homogeneizado, el producto puede enfriarse inmediatamente por debajo de 8°C (Heller et al., 2003).